

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. C.-J. Estler

Vergleichende Untersuchungen
der akuten Wirkung von Tetracyclin,
Pyrrolidinomethyl-tetracyclin und Doxycyclin
in steigenden Dosen auf den Triglyceridgehalt
von Leber und Serum männlicher Mäuse

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Martin Maywald
aus Schnabelwaid



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. C.-J. Estler

Vergleichende Untersuchungen
der akuten Wirkung von Tetracyclin,
Pyrrolidinomethyl-tetracyclin und Doxycyclin
in steigenden Dosen auf den Triglyceridgehalt
von Leber und Serum männlicher Mäuse

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Martin Maywald
aus Schnabelwaid

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. med. J. Vieth
Referent:	Prof. Dr. med. C.-J. Estler
Koreferent:	Prof. Dr. med. D. Platt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.1981

Inhaltsverzeichnis

1. Die Tetracycline

1.1. Entdeckung und Isolierung	- 1 -
1.2. Biosynthetische Zuordnung der Tetracycline	- 1 -
1.3. Aufklärung der Grundstruktur	- 2 -
1.4. Charakteristische chemische und physikalische Eigenschaften	- 4 -
1.5. Wirkungsweise und Anwendung	- 6 -
1.6. Pharmakokinetik der Tetracycline	- 11 -
1.6.1 Resorption der Tetracycline	- 11 -
1.6.2 Ausscheidung mit den Faeces	- 11 -
1.6.3 Serum-Eliminationshalbwertszeit	- 12 -
1.6.4 Serumeiweißbindung	- 13 -
1.6.5 Urinausscheidung	- 13 -
1.6.6 Speichelkonzentration	- 14 -
1.6.7 Konzentrationen in Leber und Galle	- 14 -
1.6.8 Konzentrationen in den Organen	- 14 -
1.6.9 Ausscheidung und Inaktivierung innerhalb des Organismus	- 16 -
1.7. Wege zur Wirkungsverbesserung und Struktur-Wirkungsbeziehungen	- 17 -
1.8. Komplexierungsfähigkeit der Tetracycline	- 21 -
1.8.1 Komplexbildung mit Metall-Kationen	- 21 -
1.8.2 Komplexbildung mit Anionen und Neutralstoffen	- 22 -
1.8.3 Komplexbildung mit Siopolymere	- 23 -
2. Eigenschaften der Tetracycline im biologischen Material	- 23 -
2.1. Resistenz von Bakterien gegenüber Tetracyclinen	- 24 -

3.	<u>Wirkungsweise von Tetracyclinen auf die intakte Zelle</u>	
3.1.	Hemmung der Proteinbiosynthese	- 26 -
3.1.1	Die Proteinbiosynthese	- 26 -
3.1.2	Wirkung der Tetracycline auf die Proteinbiosynthese	- 28 -
3.2.1	Wirkungsweise der Tetracycline auf die Mitochondrien	- 31 -
3.2.2	Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette durch Tetracycline	- 34 -
3.3.	Weitere Beobachtungen der Wirkung von Tetracyclinen auf den Zellstoffwechsel	- 36 -

4.	<u>Wirkung von Tetracyclinen auf die Leber und deren Triglyceridstoffwechsel</u>	
4.1.	Allgemeines	- 37 -
4.2.	Durch die Tetracycline induzierte Leberverfettung	- 38 -
4.3.	Pathogenese der durch Tetracycline induzierten Fettleber	- 39 -
4.4.	Zusammenstellung der toxischen Tetracyclinwirkungen auf die Zellen	- 47 -
4.5.	Pathohistologische Studien zur toxischen Tetracyclinwirkung	- 48 -

5.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	
	<u>Vergleichende Messungen der Veränderungen im Triglyceridspiegel von Serum und Leber bei männlichen Mäusen nach Gabe einer einmaligen intravenösen Injektion von Tetracyclin-HCl (TC), Pyrrolidinomethyl-tetracyclin (PMT) und Doxycyclin (DC) in steigenden Konzentrationen und nach verschiedener Einwirkungs-</u>	
	<u>dauer</u>	

5.0.	Einleitung	- 53 -
------	------------	--------

5.1. Methodik	- 54 -
5.1.1 Versuchstiere und Behandlung	- 54 -
5.1.2 Aufarbeitung von Blut und Organen	- 55 -
5.1.3 Triglyceridbestimmung	- 56 -
5.2. Berechnung der Meßwerte	- 56 -

Ergebnisse der Tierversuche

5.3. Serum - Triglyceride	- 57 -
5.3.1 Tetracyclin-HCl	- 57 -
5.3.2 Doxycyclin	- 57 -
5.3.3 Pyrrolidinomethyl-tetracyclin	- 57 -
5.4. Leber - Triglyceride	- 58 -
5.4.1 Tetracyclin-HCl	- 58 -
5.4.2 Doxycyclin	- 58 -
5.4.3 Pyrrolidinomethyl-tetracyclin	- 59 -
5.5. Diskussion	- 59 -
5.6. Zusammenfassung	- 84 -

Literaturverzeichnis

Nr.1 -	- 86 -
Nr.249	- 107 -

Abbildungen

Abb.: 1	5-Hydroxy-tetracyclin	- 3 -
Abb.: 2		- 5 -
Abb.: 3		- 5 -

Abb.: 4		- 6 -
Abb.: 5	Stoffwechselmechanismen, bei deren Störung Triglyceride in der Leber kumulieren können	- 40 -
Abb.: 6	Triglyceridkonzentration im Serum nach TC	- 66 -
Abb.: 7	Triglyceridkonzentration im Serum nach DC	- 68 -
Abb.: 8	Triglyceridkonzentration im Serum nach PMT	- 70 -
Abb.: 9	Triglyceridkonzentration im Serum nach PMT	- 72 -
Abb.: 10	Triglyceridkonzentration in der Leber nach TC	- 74 -
Abb.: 11	Triglyceridkonzentration in der Leber nach DC	- 76 -
Abb.: 12	Triglyceridkonzentration in der Leber nach DC	- 78 -
Abb.: 13	Triglyceridkonzentration in der Leber nach PMT	- 80 -
Abb.: 14	Triglyceridkonzentration in der Leber nach PMT	- 82 -

Tabellen

Tab.: 1	Klinisch wichtiges antibakterielles Wirkungsspektrum der Tetracycline	- 8 -
Tab.: 2	Für die therapeutische Anwendung relevante pharmakokinetische Parameter von TC, DC und PMT	- 9 u. 10 -
Erklärung zu den Tabellen 3 - 11		- 65 -
Tab.: 3	Triglyceridkonzentration im Serum nach TC	- 67 -
Tab.: 4	Triglyceridkonzentration im Serum nach DC	- 69 -
Tab.: 5	Triglyceridkonzentration im Serum nach PMT	- 71 -
Tab.: 6	Triglyceridkonzentration im Serum nach PMT	- 73 -
Tab.: 7	Triglyceridkonzentration in der Leber nach TC	- 75 -
Tab.: 8	Triglyceridkonzentration in der Leber nach DC	- 77 -
Tab.: 9	Triglyceridkonzentration in der Leber nach DC	- 79 -
Tab.: 10	Triglyceridkonzentration in der Leber nach PMT	- 81 -
Tab.: 11	Triglyceridkonzentration in der Leber nach PMT	- 83 -

Die Tetracycline

1.1. Entdeckung und Isolierung

7-Chlor-tetracyclin, Aureomycin^R, wurde 1948 als erster Vertreter dieser Antibiotikaklasse von B.M.Dugger (1) im Kulturfiltrat von *Streptomyces aureofaciens* entdeckt und daraus isoliert. 5-Hydroxy-tetracyclin, Terramycin^R, wurde 1950 von A.C.Finlay et al. (2) aus *Streptomyces rimosus* isoliert. Der Grundkörper der gesamten Tetracyclinreihe, das Tetracyclin, wurde 1953 zunächst semisynthetisch durch katalytische Hydrierung von 7-Chlor-tetracyclin erhalten (3, 4); kurz darauf konnte es durch direkte Fermentation (5) gewonnen werden. 1957 gelang es J.R.D.McCormick et al. (6) erstmals Tetracyclinderivate der 6-Desmethyl-Reihe, 6-Desmethyl-7-chlor-tetracyclin, Ledermycin^R, aus Fermentationslösungen einer Mutante von *Streptomyces aureofaciens* zu isolieren.

1.2. Biosynthetische Zuordnung der Tetracycline

Biosynthetisch leitet man die Tetracycline hauptsächlich von 9 Acetat- oder 6 Propionat-Einheiten ab, welche zu Ringsystemen (7) kondensiert sind. In die gleiche Gruppe gehören z.B. das antimykotisch wirksame Griseofulvin und die vorwiegend gegen grampositive Bakterien wirkende Fusidinsäure (7).

1.3. Aufklärung der Grundstruktur

Als erster Vertreter der Tetracyclin-Verbindungsklasse wurde das 5-Hydroxy-tetracyclin, Terramycin^R, (Abb. 1), von Woodward und einem Forscherteam der Fa. Chas. Pfizer & Co. (8) strukturell aufgeklärt.

Durch Mikrotitration wurde die Anwesenheit einer basischen (C-4) und zweier saurer Funktionen festgestellt. Da im IR-Spektrum keine Carboxy- oder Carboxylat-Bande nachweisbar war, mußte es sich bei den sauren Funktionen um phenolische(C-10) und/oder enolische (C-3 und C-12) Hydroxy-Gruppen handeln. Die Verbindung besaß acht aktive H-Atome (C-3,-4a,-5,-5a,-6,-10,-12,-12a), und die Reaktion mit Diazomethan lieferte ein Dimethyl-Derivat (C-1 und C-11). Das Diacetyl-Derivat (C-5 und C-6) besaß noch immer zwei saure Funktionen (C-3 und C-10). Ferner konnte gezeigt werden, daß die Stickstoffatome zu einer Dimethylamino- (C-4) und zu einer Carbamoyl-Gruppe (C-2) gehörten. Auch eine C-Methyl-Gruppe (C-6) konnte nachgewiesen werden (7). Mit Hilfe dieser Informationen und aufschlußreicher Abbaureaktionen konnten R.B.Woodward et al. 1953 die Strukturformel aufstellen.

Es handelt sich, wie im Namen schon angedeutet, bei den Tetracyclinen um ein System von vier linear anellierten sechsgliedrigen Ringen, welches sich vom 1,4,4a,5,5a,6,11,12a-Octahydronaphtacen ableitet und Doppelbindungen in charakteristischer Anordnung besitzt. Man unterscheidet die beiden chromophoren Bereiche A und BCD (in Abb. 1 umrandet), die durch das sp^3 -Kohlenstoffatom-12a getrennt werden. Die Kohlenstoffatome-4,4a,5,5a,6,12a sind bei entsprechender Substitution asymmetrisch. Terramycin^R und Doxycyclin^R besitzen sechs,

Aureomycin^R, Tetracyclin, Rolitetacyclin^R und Ledermycin^R besitzen je fünf Asymmetriezentren, die das Molekül optisch aktiv machen (9). Mit Ausnahme der Konfiguration am C-5 wurde diese Struktur für das 5-Hydroxy-tetracyclin (Abb. 1) durch Röntgenstrukturanalysen von J.Donohue et al. (10) und Y.Takeuchi et al. (11) bestätigt. Erst mittels NMR-Messung konnte die trans-Konfiguration der Hydroxy-Gruppe am C-5 in bezug auf diejenige am C-6 durch R.B.Woodward et al. (12, 13) endgültig bewiesen werden. Einen zusätzlichen Beweis für die Richtigkeit der aufgestellten Strukturformel erbrachte die bereits 1958 von H.Muxfeldt et al. (14) publizierte Totalsynthese von racemischem 5-Hydroxy-tetracyclin (Abb. 1).

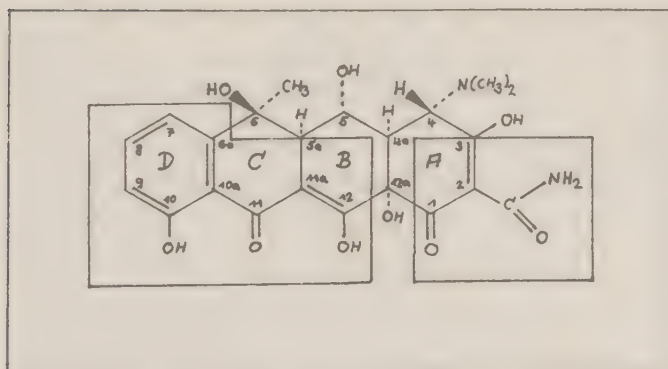


Abb.: 1

5-Hydroxy-tetracyclin

1.4. Charakteristische chemische und physikalische Eigenschaften

Die Tetracycline sind gelbe, meist kristalline, geruchlose, bitter schmeckende, lichtempfindliche Verbindungen. Im physiologischen pH-Bereich sind die natürlichen Vertreter nur sehr wenig löslich (wenige mg/ml). Eine Ausnahme in der Löslichkeit bildet das Pyrolidinmethyl-tetracyclin, Rolitetracyclin^R, welches außerordentlich gut wasserlöslich ist (1250 mg/ml bei 18°C) (15, 16) und sich daher auch für die parenterale Anwendung gut eignet. Aufgrund der sauren Gruppen und des basischen Dimethylamino-Restes verhalten sie sich amphoter. Die gemessenen pK_a -Werte liegen z.B. für Tetracyclin bei 3,30, 7,68 und 9,69, der isoelektrische Punkt liegt bei 4,80 (17). Die UV-Spektren der Tetracycline sind sehr charakteristisch. Im Grundkörper der Tetracyclinreihe absorbiert der BCD-Chromophor bei 225, 285, 320 und 360 nm, der Ring-A-Chromophor bei 262 nm. Eine Bande bei 275 nm setzt sich aus mehreren Absorptionen zusammen (19). Die Fluoreszenz von Tetracyclinen, die durch Komplexierung mit Kationen verstärkt wird, kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser Stoffe in Arzneimitteln und biologischen Material herangezogen werden (18 - 59). Eine Zusammenfassung chemischer und physikalischer Bestimmungsmethoden von Tetracyclinen geben Hughes und Wilson (60).

Tetracycline geben unter milden Bedingungen eine Reihe von Abbau- und Umwandlungsreaktionen mit interessanten Unterschieden zwischen den einzelnen Vertretern (61 - 68).

Tetracycline mit einer Hydroxy-Gruppe an C-6 spalten bei pH42 leicht Wasser ab und bilden unter Aromatisierung von Ring C Anhydro-

Tetracycline (Beispiel in Abb. 2).

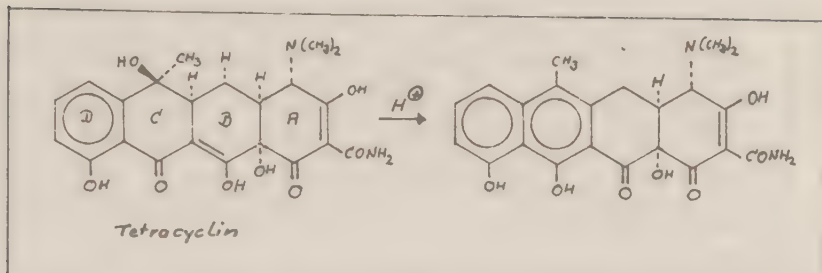


Abb.: 2

Im Falle des Oxytetracyclins, Terramycin^R, isoliert man anstelle der Anhydroverbindung die in einer raschen Folgereaktion entstehenden epimeren α - und β -Apooxytetracycline (Beispiel in Abb. 3).

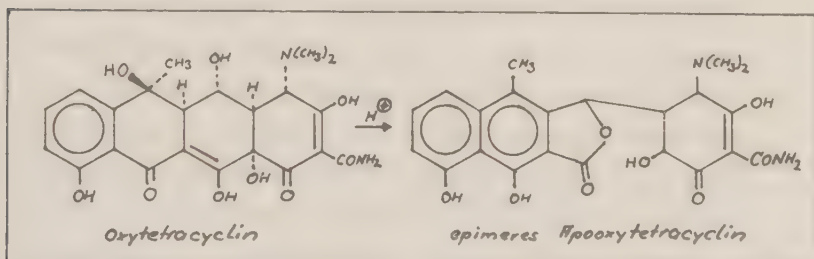


Abb.: 3

In Gegenwart von Basen isomerisieren die Tetracycline zu iso-Tetracyclinen. Chlortetracyclin, Aureomycin^R, ist besonders labil und bildet schon bei pH=7,5 in der Wärme iso-Chlortetracyclin (Beispiel in Abb. 4)

Entsprechend ihrer chemischen Verwandtschaft weisen alle Tetracycline ein sehr ähnliches Wirkungsspektrum auf. Eine orientierende Übersicht vermittelt " Tab. 1 " (75). Deutliche Lücken in ihrem antibakteriellen Spektrum zeigen die Tetracycline nur bei den Pseudomonas-Arten, Proteus und Salmonellen. Ansonsten werden sie in der Wirkungsbreite nur vom Chloramphenicol übertroffen, das aber aufgrund seiner höheren Toxizität erst das Mittel zweiter Wahl ist. Für die Behandlung von Staphylokokken-, Streptokokken- und Pneumokokken-Infektionen gelten die Tetracycline heute nicht mehr als Mittel der ersten Wahl. Gegen Tetracycline resistent sind Mycobakterien, Protozoen, Pilze und Hefen (75). Hauptindikationen aus klinischer Sicht sind Gallenwegsinfektionen, bakterielle Erkrankungen der Atemwege, bakterielle Mischinfektionen, die vom Mund, Rachen oder Intestinaltrakt ausgehen, und bakterielle Infektionen des Urogenitaltraktes mit empfindlichen Keimen. Die einzelnen Tetracyclinderivate unterscheiden sich weniger in der Wirkungsintensität als vielmehr in den pharmakokinetischen Eigenschaften wie Resorption, Gewebediffusion und Elimination. Dies gilt auch für die partialsynthetischen Tetracycline. " Tab. 2 " vermittelt eine Übersicht über die wichtigsten biochemischen Parameter am Untersuchungsmodell Mensch für die drei von uns verwendeten Tetracyclinderivate: Tetracyclin-HCl (TC), Pyrrolidin-methyl-tetracyclin (PMT) und Doxycyclin (DC) (76).

Klinisch wichtiges antibakterielles Wirkungsspektrum der Tetracycline

Gram-positive Bakterien

Wirksam bei:

- a) pyogene Kokken
 - Pneumokokken
 - Staphylokokken
 - Streptokokken
- b) Listerien

Nicht wirksam bei:

- a) Clostridien

Gram-negative Bakterien

Wirksam bei:

- a) pyogene Kokken
 - Gonokokken
 - Meningokokken
- b) Enterobakterien
 - E. coli
 - Klebsiellen
 - Shigellen
- c) Vibrio cholerae
- d) Brucellaceae
- e) Bacteroides

Nicht wirksam bei:

- a) Enterobakterien
 - Salmonellen
 - Proteus
- b) Pseudomonas

Bakterielle Infektionen - nicht nach Gram klassifizierbar

Wirksam bei:

- a) Chlamydien
- b) Mykoplasmen
- c) Rickettsien
- d) Spirochäten: Borelien
 - Treponemen
 - Leptospiren

Tab. 1

Nach E. Wiesmann, Med. Mikrobiol., 4. Aufl. (76)

	Tetracyclin-HCl (oral)		Doxycyclin (oral)		Reverin (i.v.)	
	MeQ- wert	Lit.:	MeQ- wert	Lit.:	MeQ- wert	Lit.:
Serum-Eliminationshalb- wertzeit nach einmaliger Gabe in h (ad 3)	7,9 ± 1,2	59 77 89 90 123	12,8 ± 5,3	77 78 83 95-99 111 115 243	7,2 ± 1,2	243
Applikation zur Auf- rechterhaltung kon- stanter Serumspiegel	500 mg / 8 h	38 79 88 121	init. Pos. 200 mg dann 100 mg / 24 h	19 34 36 77 81 91-94 101	250 mg / 8 h	244 245
Tagesdosis in mg	1500		1000		750	
Intestinale Resorp- tion nach oraler Gabe in % (ad 1)	70-80%	76 78-81	93%	75 243	-	
Ausscheidung mit Faeces (ad 2)	20-50%	45 85	20-40%	31 41 86 87	4-10%	244 245
Urinausscheidung nach einmaliger Gabe in 24h		59 89		34 59		96 99
1) Clearance	61%		20%	89,92	66%	
2) freie Fraktion im Serum	36-45%	↑	7-18%	↑ 76 100	50%	↑

Tab.: 2

Für die therapeutische Anwendung relevante pharmakokinetische
Parameter von Tetracyclin-HCl, Doxycyclin und Reverin.
Alle Angaben beziehen sich auf Messungen am Menschen.

	Tetracyclin-HCl (oral)		Doxycyclin (oral)		Reverin (i.v.)	
	Meß- wert	Lit.:	Meß- wert	Lit.:	Meß- wert	Lit.:
nicht resorbierter An- teil der zugeführten Tagesdosen in %	23%	243 244 245	7%	243 244 245	-	
Ausscheidung mit der Galle und aktive Sekretion in %	7%	242	20%	34 36 95 92	7%	242
Konzentration in der Galle der Gallen- blase (ad 7) µg/ml	5-80	242	4-19	34 36 92 93	12-69	242
Konzentration in der Lebergalle in µg/ml	-		ca. 17,5		-	
Kolon-Tageskonzen- tration in mg (ad 1)	360	32 76	28	32 76	52	244 245
Max. Serumspiegel nach einmaliger Gabe in µg/ml (ad 1)	-		2,1- 4,4	76	nach 15 min. 8,8 nach 8 h 1,44	244 245
Eiweißbindung an Serumprotein (ad 4)	55-64%	83 99	82-93%	83 96-99 113 126	75-91%	83 99

Tab.: 2 Für die therapeutische Anwendung relevante pharmakokinetische Parameter von Tetracyclin-HCl, Doxycyclin und Reverin.
Alle Angaben beziehen sich auf Messungen am Menschen.

1.6. Pharmakokinetik der Tetracycline

1.6.1 Resorption der Tetracycline

Nach oraler Gabe soll das ideale Antibiotikum so schnell und vollständig wie möglich resorbiert werden. Unvollständige Resorption verringert die therapeutische Wirksamkeit und führt zu hohen Antibiotikakonzentrationen im Darm, die für unerwünschte Nebenwirkungen, welche die Anwendung der ersten Tetracycline stark belastet haben, verantwortlich sind.

Man berechnet die vom Verdauungskanal aus resorbierte Menge an Antibiotikum, indem man die auf die Anfangszeiten extrapolierten Serumkonzentrationen nach intravenöser Injektion des Antibiotikums (wobei der Resorptionsverlust nicht auftritt und nach oraler Verabreichung miteinander vergleicht. Derselbe Vergleich wird für die mit dem Urin ausgeschiedenen Gesamtmengen herangezogen. (76 - 81)

1.6.2 Ausscheidung mit den Faeces

Die Antibiotikakonzentration im Ileum und Kolon hängt nicht nur von dem nicht resorbierten Anteil ab, sondern auch von der notwendigen täglichen Dosierung (85 - 87)!

Man findet nicht geklärte individuelle Unterschiede in der Intensität und Schnelligkeit der intestinalen Resorption der Tetracycline.

Meistens beruhen anormal tiefe Werte im Serum und anormal hohe Werte in den Faeces auf Interaktionen mit anderen Medikamenten oder Nahrungsmitteln. Besonders stark wird die intestinale Resorption aller Tetracycline durch gleichzeitige Einnahme von Aluminium-

hydroxid (in Antacida) (82, 83) oder von Magnesiumsulfat (84) verringert. Tetracyclin und Doxycyclin nimmt man vorteilhafterweise zu den Mahlzeiten ein, um dadurch eine bessere Magenverträglichkeit zu gewährleisten. Die Resorption wird im allgemeinen dadurch nicht beeinträchtigt (83). Vorsicht ist geboten bei Milch, da das hierin enthaltene Calcium mit den Tetracyclinen schwer lösliche Komplexe bildet und somit die intestinale Resorption verringert wird (76, 83).

1.6.3 Serum-Eliminationshalbwertszeit

Nach Erreichen des Maximums weist der Serumspiegel der Tetracycline eine Abnahme auf, welche in halblogarithmischer Darstellung durch eine Gerade beschrieben wird. Diese gestattet es, die Halbwertszeit des Medikamentes im Serum zu berechnen (= die Zeitspanne, in der sich die Konzentration im Serum um die Hälfte verringert hat). Die Bedeutung der Halbwertszeit für die praktische Anwendung besteht darin, daß man aus ihr die Zeitabstände und die Höhe der Dosierung eines Medikamentes berechnen kann, um einen möglichst gleichmäßigen Serumspiegel zu erhalten.

Der Vorteil eines Antibiotikums, das in hohem Maß resorbiert und langsam ausgeschieden wird, ist ein doppelter: Die Dosen und damit das Ausmaß der Ausscheidung mit den Faeces und den daraus resultierenden Verdauungsstörungen können beträchtlich verringert werden, ganz zu schweigen von den toxischen Wirkungen und den wirtschaftlichen Konsequenzen. Andererseits erlaubt es eine Beschränkung der Dosishäufigkeit, was besonders bei Patienten in ambulanter Behandlung wichtig ist, vor allem bei undisziplinierten Patienten sowie

in Fällen mit Langzeitbehandlung.

Aufgrund der minimalen Hemmkonzentrationen der Tetracycline für verschiedene Keime betragen die therapeutisch wünschbaren Serumspiegel zwischen 0,8-1,0 und 3,0-5,0 $\mu\text{g/ml}$. (19, 34, 36, 38, 59, 77-79, 81, 83, 88-99, 101, 110, 121, 126)

1.6.4 Serumeiweißbindung

Die Ausscheidungsbedingungen und das Verhalten der Tetracycline beruhen zu einem großen Teil auf ihrer Bindung an die Serumproteine. Man hat unter anderem festgestellt, daß der pH-Wert des untersuchten Milieus hier eine entscheidende Rolle spielt. So sind beim Doxycyclin die Resultate, die man bei pH=4,5 und 7,4 erhält, völlig verschieden. Wie Williamson (96) klar bewiesen hat, erlaubt nur der physiologische pH-Wert von 7,4 eine korrekte Beurteilung der Bindung an die Proteine. (76, 83, 96, 98, 99, 103, 126)

1.6.5 Urinausscheidung

Die Urinausscheidung der Tetracycline wird vom Anteil des freien (nicht an Protein gebundenen) und deshalb für die Filtration durch die Glomeruli verfügbaren Antibiotikums im Serum bestimmt. Die Angaben in Tab. 2 zeigen, daß die renale Clearance der Tetracycline gleichzeitig mit dem Prozentsatz des freien Antibiotikums im Serum zunimmt. Die Angaben, über die man verfügt, erlauben, in einigen Fällen die Möglichkeit einer geringen tubulären Rückresorption, vor allem beim Doxycyclin, in Erwägung zu ziehen. Dagegen ist die tubuläre Sekretion, wie sie für andere Tetracycline angenommen wird, für Doxycyclin (100) und Pyrrolidino-methyl-tetracyclin (Reverin) (99) unwahrscheinlich, denn deren Clearance-Werte ändern sich in Abhängig-

keit vom Glomerulumfiltrat, welchen Wert dieses oder die Plasmakonzentrationen auch haben mögen (keine kompensatorische tubuläre Ausscheidung). Probenecid ändert die Ausscheidung der Tetracycline nicht (104). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Urinkonzentrationen der Tetracycline von der im Urin ausgeschiedenen Menge und von der Schnelligkeit dieser Ausscheidung abhängen. (76, 89, 92, 98)

1.6.6 Speichelkonzentration

Die Speichelkonzentrationen der Tetracycline sind 4 - 10 mal schwächer als die des Serums. (76, 93, 101, 102)

1.6.7 Konzentrationen in Leber und Galle

Die Tetracyclinkonzentrationen in der Lebergalle verlaufen parallel zu den Serumspiegeln, sind aber nach Fabre et al. (76) 5 mal höher als im Serum. Durch Reduktion des Gallenvolumens in der Gallenblase verdreifacht sich dieser Spiegel, wodurch 15 mal höhere Werte als im Serum resultieren. Aus den Untersuchungen geht jedoch nicht hervor, ob gleichzeitig eine intestinale Sekretion der Tetracycline erfolgt. (34, 36, 76, 92, 93, 242)

1.6.8 Konzentrationen in den Organen

Die therapeutische Wirksamkeit eines Antibiotikums hängt weniger von seinen Serumspiegeln ab als von seiner Fähigkeit, in die Gewebe, vor allem entzündete Gewebe, einzudringen. Hierbei spielt die Fettlöslichkeit wahrscheinlich die größte Rolle bei der Fähigkeit der Tetracycline, in die Gewebe zu diffundieren:

beim Hund wächst das Verhältnis: $\frac{\text{Konzentration in den Geweben}}{\text{Konzentration im Serum in freier Form}}$

der verschiedenen Tetracycline in Abhängigkeit von deren Löslichkeit in Chloroform (105). Dieser Index ist am höchsten beim Doxycyclin, gefolgt von Tetracyclin.

Alle Tetracycline dringen gut in die Exsudate der Pleuren und Gelenke ein (106), ebenso in das Kammerwasser (107, 108). Ihre Diffusion in den Liquor cerebrospinalis ist unter physiologischen Bedingungen minimal. Sie verstärkt sich etwas bei Meningitis, aber nicht in dem Maße, um Antibiotika dieser Gruppe bei Infektionen der Meningen zu Mitteln der Wahl zu machen (109, 110). Man findet ausreichend bakteriostatische Mengen im Sinus (111) und Abszesseiter (112). Die Tetracycline dringen aber nicht nur in die extrazelluläre Flüssigkeit der Organe ein, sondern auch ins Innere der Zellen. Das wurde klar gezeigt für Leukozyten (113), Makrophagen (114) und Erythrozyten (113, 115). Schließlich sei noch daran erinnert, daß die Tetracycline eine besondere Affinität zu Tumoren und nekrotisierenden Geweben haben, wo ihre Fluoreszenz besonders intensiv ist. Außer ihrem zusätzlichen therapeutischen Interesse wurde diese Besonderheit weithin in der Onkologie sowie bei der anatomischen Diagnostik des Myokardinfarktes (116), bei isolierten Manifestationen von Nekrosen der Nierentubuli (117, 118) oder von Arteriosklerose (119) genützt. (76)

Die Tetracycline verschwinden relativ schnell aus den verschiedenen Geweben, ausgenommen Tumoren, Knochen und Zähne (120 - 122). Ihr Verweilen während Wochen und Monaten kann durch ihre gelb leuchtende Fluoreszenz nachgewiesen werden. (76)

1.6.9 Ausscheidung und Inaktivierung innerhalb des Organismus

Tetracycline scheinen im menschlichen Organismus wenig oder nicht abgebaut zu werden, aber man verfügt über keine exakten Unterlagen, die dies bestätigen. Genaue Konzentrationsbestimmungen im Urin und Faeces zeigten, daß bei allen Tetracyclinen ein Ausscheidungsdefizit bei Vergleich mit der zugeführten Antibiotikamenge besteht (123). Die minimalen Mengen, die in der Leber oder den Knochen gespeichert werden, können einen so bedeutenden Verlust nicht erklären. Fabre et al. (76) wies nach, daß die fehlenden Mengen mittels mikrobiologischer Methoden nicht wiedergefunden werden können. Sie wurden zum größten Teil in mikrobiologisch unwirksamer Form durch chemische Transformation oder Chelatbildung ausgeschieden. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung stehen noch an. (76)

1.7 Wege zur Wirkungsverbesserung und Struktur-Wirkungsbeziehungen

Trotz ihres breiten Wirkungsspektrums sind die Tetracycline keineswegs ideale Chemotherapeutika, die jede bakterielle Erkrankung heilen.

Im Laufe der Jahre beobachtete man bei ihrer häufiger werdenden Anwendung manche Schwächen und Nebenwirkungen. Da die Kliniker immer höhere Anforderungen an die Wirksamkeit und Sicherheit stellten, wurden weltweit Anstrengungen zur Entwicklung neuer Tetracycline mit verbesserten Eigenschaften unternommen. Dazu wurde die Struktur dieser Moleküle mit chemischen und enzymatischen Methoden abgewandelt, um die Bedeutung der einzelnen Strukturelemente für die biologische Aktivität zu ergründen (9). Durch Isolierung neuer Stämme, Mutationen bekannter Streptomyces-Stämme, Variationen der Fermentationsmedien, Zusätzen von Vorläufern ("precursors") und Inhibitoren erhielt man etwa zwanzig neue Tetracycline, von denen einige medizinisch, andere nur für das Studium der Biogenese oder als Vorstufen für neue Synthesen interessant waren (124 - 128).

Der meist begangene Weg zu neuen Tetracyclinen war und bleibt jedoch die chemische Abwandlung der fermentativ einfach zugänglichen Vertreter, nämlich Tetracyclin, Oxytetracyclin, 6-Desmethyl-tetracyclin und 6-Desmethyl-chlor-tetracyclin.

Pyrrolidinmethyl-tetracyclin (PMT - Rolitetracyclin - Reverin^R) war das erste partialsynthetische Tetracyclin. Es entsteht durch Mannich-Reaktion aus Tetracyclin, Formaldehyd und Pyrrolin (129 - 131). Der große Vorteil gegenüber Tetracyclin liegt in der enorm hohen Wasserlöslichkeit (1250 mg/ml bei 18°C) (15, 16) im physiologischen pH-Bereich. Damit ist Reverin eine ideale parenterale

Applikationsform des Tetracyclins. Während es in fester Form völlig stabil ist, zerfällt es in wäßrigen Lösungen langsam bis zu einem Gleichgewicht (132) unter Rückbildung von Tetracyclin (133 - 135). Methacyclin (Rendomycin^R) und Doxycyclin (DC = Vibramycin^R) sind Weiterentwicklungen von Oxytetracyclin (5-Hydroxy-tetracyclin = Terramycin^R). Doxycyclin entsteht durch radikalische Addition an die 6-Methylen-Doppelbindung von Methacyclin und anschließende Entschwefelung mit Raney-Nickel (136).

Das neueste Antibiotikum der Tetracyclin-Gruppe ist das Minocyclin. Es wird durch reduktive Methylierung der Nitrogruppe in Stellung C-7 des Ringes D erhalten (138). Weiterhin fehlen die instabilen sterischen Gruppen an C-5 und C-6, wodurch gleichzeitig eine Erniedrigung der Zahl der Asymmetriezentren im Molekül resultiert. Die wichtigsten Vorteile sind ähnlich wie beim Doxycyclin nur pharmakokinetischer Natur. Jedoch fällt im mikrobiologischen Wirkungsspektrum von Minocyclin die größere Wirksamkeit gegen eine Reihe von gram-positiven Staphylokokkenstämmen auf, die sonst gegen andere Tetracycline bereits resistent geworden sind (139 - 141).

Da die Tetracycline die Proteinsynthese hemmen (137, 164 - 187), wurden Untersuchungen darüber angestellt, welche strukturellen Voraussetzungen die Tetracycline erfüllen müssen, um die Proteinsynthese an isolierten Ribosomen zu hemmen. Die nicht sehr zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiet ergeben, daß selbst relativ kleine Veränderungen in der Struktur den Hemmeffekt beträchtlich beeinflussen können:

- 1) Chlorierung in 7-Stellung erhöht die hemmende Wirkung erheblich.

(137)

- 2) Epimerisierung der 4-Dimethylamino-Gruppe setzt die Aktivität ziemlich herab (137).
- 3) Sowohl 4a,12a-Anhydro- als auch 5a,6-Anhydro-tetracycline sind viel weniger aktiv als Tetracyclin selbst (137).
- 4) Die Ringöffnung von Chlortetracyclin und Tetracyclin, die zu den Iso-Derivaten führt, und die von Oxytetracyclin, welches die α - und β -Isomeren von Apo-oxytetracyclin ergibt, äußert sich ebenfalls in einem Aktivitätsverlust (137).
- 5) Die lineare Anordnung der vier Ringe und die beiden chromophoren Keto-enol-Systeme im Ring A und in den Ringen BCD sind eine wesentliche Voraussetzung für die antibiotische Wirksamkeit. Alle partial- und totalsynthetischen Derivate mit weniger als vier Ringen sind wirkungslos (9).
- 6) Abwandlungen im stark delokalisierten 1,3-Keto-enol-System durch Verätherung führen zum völligen Wirkungsverlust (9).
- 7) Veränderungen in 2-Stellung mit Ersatz der Carboxamid-Gruppe durch Aldehyd- (142), Aldimin- (143) oder Acetyl-Gruppe (145) führt zu Lücken im Wirkungsspektrum.
- 8) Die Aminoalkylierung der Amid-Gruppe in 2-Stellung nach Mannich (129, 130, 146, 147) führt zu gut wasserlöslichen und langsam hydrolisierenden Derivaten (wie z.B. PMT), die das gleiche Wirkungsspektrum wie die zugrundeliegenden Tetracycline besitzen (9).
- 9) Alle totalsynthetischen 5a-Epi-tetracycline (145) zeigen in vitro hohe Aktivität, enttäuschten aber im Tierexperiment (77).
- 10) Den größten Erfolg bei der Entwicklung neuer hochwirksamer Tetracycline brachte die Veränderung der 6-Stellung (146). Die Eliminierung der 6-Hydroxy-Gruppe führte zu lipophileren, säurestabilen

Tetracyclinen, wie Doxycyclin (Vibramycin^R), Methacyclin (Rendomycin^R) und Minocyclin (Klinomycin^R).

- 11) Auffallend ist, daß bei Substitution der säurestabilen 6-Desoxy-tetracycline in 7-Stellung und/oder 9-Stellung mit Substituenten, die starke Elektronendonatoren, als auch solche mit starker Acceptorwirkung sind, eine erhebliche Wirkungssteigerung dieser Derivate erfolgt (65, 146).
- 12) Veränderungen am 11,12-Diketon-System führen zu einer Wirkungsverschlechterung (9).

Faßt man die Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

- a) Das Grundgerüst des Tetracyclinmoleküls mit den chromophoren Keto-enol-Systemen in den Ringen A sowie BCD und der basischen Funktion im Ring A ist die wesentliche Voraussetzung für die antibiotische Wirksamkeit.
- b) Die Konfiguration an den Asymmetriezentren C-4, C-4a und C-12a ist essentiell, während sie an C-5, C-5a und C-6 variiert werden kann.
- c) Der Amid-Wasserstoff läßt sich durch eine Methyl-Gruppe substituieren. Größere Reste wirken sich negativ aus, mit Ausnahme solcher, die in Wasser spontan abspalten.
- d) Die Dimethylamino-Gruppe kann ohne Verlust der in-vitro-Aktivität durch eine primäre Amino-Gruppe ersetzt werden; alle anderen Veränderungen führen zu einer Verschlechterung der bakterio-statischen Wirkung.
- e) Der hydrophile Teil des Moleküls von C-5 bis C-9 ist in vielfältiger Weise abwandelbar. Besonders Modifikationen an C-6 und C-7 ergeben Produkte mit größerer chemischen Stabilität, gesteigerter antibiotischer Wirksamkeit und günstigerer Pharmakokinetik (9).

1.8 Komplexbildungsfähigkeit der Tetracycline

Tetracycline zeigen eine große Tendenz zur Bildung reversibler Komplexe mit Kationen und Anionen sowie nieder- und hochmolekularen Stoffen (21 - 32, 63, 117, 148). Diese Eigenschaft ist für das Verständnis ihrer antibiotischen Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von entscheidender Bedeutung.

1.8.1 Komplexbildung mit Metall-Kationen

Die Komplexbildung hängt von der Natur und der Ladung des Kations und dem pH-Wert der Lösung ab. Unterhalb von pH=3 komplexieren die Tetracycline nicht. Im pH-Bereich zwischen pH=3 - 7 bindet das Phenoldiketon-System der Ringe BCD ein Kation. Wird die 4-Dimethylamino-Gruppe bei steigendem pH-Wert deprotoniert, so kann ein weiteres Kation von dieser Gruppe und der dazu cis-ständigen 12a-Hydroxy-Gruppe gemeinsam gebunden werden. Oxytetracyclin und davon abgeleitete Verbindungen, wie z.B. Doxycyclin, besitzen in 5-Stellung einen zusätzlichen Liganden zur Komplexbildung. Mg^{2+} -Ionen bilden oberhalb pH=7 ein Chelat zwischen der 5- und 12a-Hydroxy-Gruppe.

Die meisten Metallkomplexe fluoreszieren stärker als die zugrundeliegenden Tetracycline selbst. Diesen Effekt nutzt man zur analytischen Bestimmung von Derivaten dieser Antibiotikaklasse in Arzneimitteln und biologischem Material aus (9, 32, 60). Cashwell et al. (34, 35) zeigten, daß die Fluoreszenz von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Chlortetracyclin eine Funktion der Polarität des umgebenden Milieus ist, und zum Nachweis dieser Ionen in Zellmembranen benutzt werden kann.

Die gleichzeitige Verabreichung von Tetracyclinen und Nahrungsmitteln oder Arzneimitteln, die Metall-Ionen enthalten, führt zu einer Erniedrigung der Tetracyclin-Serumspiegel, da die gebildeten Chelate zu groß für die Membranen sind und kein geeignetes Carrier-System in den Membranen zur Verfügung steht. Lange bekannt ist die Einlagerung von Tetracyclinen als Calciumphosphat-Komplex in Gewebe, die reich an Ca^{2+} -Ionen sind, weshalb es bei Kindern bis zu acht Jahren zu einer Schädigung des Knochenwachstums und der Dentition kommen kann. Aus dem gleichen Grund ist in der Schwangerschaft die Anwendung von Tetracyclinen zum Schutz des ungeborenen Kindes nicht mehr empfohlen, wenn mit Penicillinen oder anderen weniger toxischen Antibiotika der gleiche Effekt erzielt werden kann. (9, 73)

1.8.2 Komplexbildung mit Anionen und Neutralstoffen

Anionen, wie Phosphat, Citrat, Salicylat, p-Hydroxybenzoat und das Saccharin-Anion als auch Naturstoffe vom Typ des Coffeins, N-Methylpyrrolidons, Harnstoffs und Thioharnstoffs und vielen anderen Verbindungen mehr, bilden mit Tetracyclinen schwache Komplexe und erhöhen deren Löslichkeit (41).

Polyvinylpyrrolidon (42), das auch als Plasmaexpander (Periston^R) Verwendung findet, dient in galenischen Zubereitungen von Injektionen mit Oxytetracyclin (Vendarcin^R) (43) und Doxycyclin (Vibravenös^R) (44) als Lösungsvermittler. Es erhöht die Stabilität solcher Lösungen und soll die Gewebeverträglichkeit dieser Präparate bei parenteraler Applikation verbessern (9).

1.8.3 Komplexbildung mit Biopolymeren

Die reversible Bindung der Tetracycline an makromolekulare Strukturen im Blut und Gewebe ist von Bedeutung für die Pharmakokinetik und die antibiotische Wirksamkeit dieser Substanzen.

Tetracycline binden sowohl an Albumin, als auch an Globuline und Lipoproteine (speziell β -Lipoproteine). Diese Proteinbindung ist reversibel, pH- und temperaturabhängig und eine Funktion der Serumkonzentration (46, 52). Allerdings unterscheiden sich die Serumproteine von Mensch und Tier in ihrer Affinität für bestimmte Tetracycline (46).

Die Serumbindung ist hydrophober Natur. Sie wird durch polare hydrophile Gruppen, wie z.B. Hydroxy- oder Amino-Gruppen, geschwächt (47, 48, 53). Mit steigenden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen nimmt die Serumbindung zu, ist aber von der Natur des Tetracyclinderivates abhängig (76). Die größte prozentuale Zunahme der Komplexbildung wurde bei Doxycyclin, die kleinste bei Oxytetracyclin gefunden (9, 76).

Die reversible Bindung der Tetracycline an RNA folgt den beim Serumalbumin gefundenen Gesetzmäßigkeiten und ist auch hinsichtlich der Bindungsstärke vergleichbar (48).

Der Einfluß der Serumproteinbindung auf die chemotherapeutische Wirksamkeit von Antibiotika ist noch in vielen Punkten unklar (54 - 59).

2. Eigenschaften der Tetracycline im biologischen Material

Tetracycline hemmen zahlreiche lebenswichtige enzymatische Reaktionen in Bakterien und Säugetierzellen (85, 137, 170 - 178); zu nennen sind hier die oxidative Phosphorylierung (170 - 178), der Elektronentrans-

port (170 - 178) und die Proteinbiosynthese (137, 170 - 183). Allerdings liegen hier die Hemmkonzentrationen häufig wesentlich höher als sie zu einer antibiotischen Wirksamkeit (Bakteriostase) notwendig sind. Nach heutiger Lehrmeinung übt nur das ungebundene Antibiotikum in der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums im infizierten Bereich eine antibakterielle Wirkung aus. Je höher die Konzentration an freiem Wirkstoff dort ist, desto größer ist auch die Bakteriostase bzw. Bakterizidie (85).

2.1 Resistenz von Bakterien gegenüber Tetracyclinen

Mit der häufigen Verwendung von Tetracyclinen erhöhte sich auch die Zahl der resistenten Bakterienstämme (146 - 151). Sämtliche Untersuchungen zeigen, daß das Ansteigen der Resistenz mit der zunehmenden Verwendung von Tetracyclinen parallel geht. Zwischen den einzelnen Tetracyclinen besteht eine weitgehende Kreuzresistenz.

Im letzten Jahrzehnt setzte sich die Erkenntnis durch, daß die übertragbare Resistenz bei bakteriellen Erregern aus menschlichem und tierischem Material vorherrschend und zudem gefährlich ist. Die übertragbare Resistenz wird durch chromosomale oder extrachromosomale DNA-Elemente (sogenannte R-Faktoren, Plasmide und Episomen) von Keim zu Keim übertragen. In der Regel trägt ein solches DNA-Element mehrere Resistenzgene, so daß die Trägerbakterien gegen chemisch unterschiedliche, nicht kreuzresistente Antibiotika (z.B. Tetracyclin, Streptomycin, Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Ampicillin und dazu noch gegen Sulfonamide = höchste beobachtete Mehrfachresistenz!) resistent werden (152). Dies hat wesentlich zur Entwicklung tetra-

cyclinresistenter Bakterienstämme, vor allem bei Staphylokokken, Streptokokken und den Keimen aus der Familie der Enterokokken, getragen. Alle Bemühungen, ein Tetracyclin zu entwickeln, das der zunehmenden Resistenz auf breiter Front begegnet, sind bislang erfolglos geblieben. (148, 153 - 156)

Als weitere Ursache für eine Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber den Tetracyclinen ist ihre Verwendung in Futtermitteln in sogenannten nutritiven Dosen zur Wachstumsförderung von gesunden Tieren anzunehmen. Innerhalb der EWG wurde nunmehr diesem Mißbrauch durch neuere gesetzliche Bestimmungen Rechnung getragen (157).

Mehrere Arbeitskreise konnten zeigen, daß die Resistenz gegenüber Tetracyclinen auf einer verminderten Permeabilität der Bakterienzellwand beruht (158 - 162).

Bakterienzellen besitzen nämlich im Gegensatz zu Säugetierzellen die Fähigkeit, Tetracycline entgegen einem Konzentrationsgradienten anzureichern. Diese Anreicherung, ein wesentlicher Faktor für die selektive chemotherapeutische Wirksamkeit der Tetracycline, ist energieabhängig und wird durch die oligomycinähnliche Wirkung von Tetracyclinen auf die oxidative Phosphorylierung beeinflusst (160, 163).

Zweiwertige Ionen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , scheinen dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen, da die Fähigkeit der Membranen Tetracyclin zu absorbieren, durch die Vorbehandlung mit dem Komplexbildner ÄDTA verloren geht. Die molekularen Komponenten, welche den selektiven Transport bewirken, sind fest mit der Zellmembran verbunden (137).

Eine enzymatische Inaktivierung von Tetracyclinen in der resistenten Bakterienzelle ist bis heute nicht bekannt (163).

3. Wirkungsweise von Tetracyclinen auf die intakte Zelle

3.1. Hemmung der Proteinbiosynthese

Es ist beachtlich, wie viele antimikrobielle Substanzen die Proteinbiosynthese hemmen (85, 137). In allen bisher untersuchten Fällen scheint die Hemmung den einen oder anderen Vorgang zu betreffen, der sich an den Ribosomen abspielt. Unter den Hemmstoffen gibt es viele chemisch unterschiedliche Verbindungen. Während die inhibierte Reaktion in einigen Fällen mit ziemlicher Genauigkeit festgelegt werden konnte, ist die molekulare Wechselwirkung zwischen Wirkort und dem Hemmstoff im allgemeinen immer noch schwer zu erfassen.

Um die Wechselwirkung von Tetracyclinen und Ribosomen besser verstehen zu lernen, sei es mir erlaubt eine Darstellung der allgemeinen Vorgänge bei der Proteinbiosynthese, soweit sie heute bekannt sind, voranzustellen.

3.1.1 Die Proteinbiosynthese

Man unterscheidet zwei Ribosomenarten. Die 80S-Ribosomen kommen offensichtlich nur in eukaryotischen Zellen vor, während die 70S-Ribosomen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen anzutreffen sind. Das 80S-Partikel dissoziiert reversibel in 60S- und 40S-Untereinheiten und das 70S-Partikel in 50S- und 30S-Untereinheiten, wenn die Mg^{2+} -Konzentration der Lösung abnimmt. An diesen komplexen Partikeln wird die genetische Information in Form von Messenger-RNA in Proteine übersetzt. Die Vorgänge, die zur Proteinsynthese führen, lassen sich in drei Phasen unterteilen:

1) Start: Zunächst wird ein Startkomplex gebildet, wobei m-RNA und der spezifische Starter, N-Formyl-methionyl-t-RNA (f-meth-t-RNA) an die 30S-Untereinheit gebunden werden. Der Anticodonbereich der f-meth-t-RNA tritt mit dem Startcodon AUG der m-RNA in Wechselwirkung. Gleichzeitig wird die 50S-Untereinheit an das 30S-Partikel angelagert. Bei der Entstehung des Startkomplexes spielen eine Anzahl weiterer Proteinfaktoren eine Rolle, wie die Faktoren F1, F2, F3 und GPT, das durch Spaltung in GPD und anorganisches Phosphat zerlegt wird und den nächsten Schritt der Bindungsreaktion einleitet.

2) Ausbildung der Peptidbindung und Kettenverlängerung:

Nach der allgemein vertretenen Theorie bindet f-meth-t-RNA während der Bildung des Startkomplexes an die Akzeptorstelle und wird dann zur Donorstelle verschoben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Translokation. Die Codon-Anticodon-Wechselwirkung bleibt während der Translokation bestehen. Zur Bindung der nächsten spezifischen Aminoacyl-t-RNA an die Akzeptorstelle ist ein Faktor "T" und GPT erforderlich. Die Carboxyl-Gruppe des N-Formyl-methionins, das mit der Donorstelle über seine t-RNA verknüpft ist, reagiert mit der Amino-Gruppe der Aminosäure an der Akzeptorstelle und bildet die erste Peptidbindung. Gleichzeitig wird die t-RNA an der Donorstelle vom Ribosom abgehängt und kann wiederverwendet werden. Die Bildung der Peptidbindung wird durch die Peptidyl-Transferase katalysiert, die vermutlich ein Protein der 50S-Untereinheit ist. Das dabei entstehende Dipeptid bleibt über sein C-terminales Ende mit der zweiten t-RNA an die Akzeptorstelle gebunden.

3) Abschluß und Freisetzung der Polypeptidkette:

Diese Reaktionsfolge wiederholt sich zyklisch, wobei nacheinander die Trinukleotid-Codons der m-RNA Übersetzt werden, bis eines der drei Terminations-Codons (UAA, UAG, UGA) an der Akzeptorstelle erscheint. Das ist das Signal dafür, daß das fertige Polypeptid von der t-RNA abgehängt wird, die mit der C-terminalen Aminosäure verbunden ist. An diesem Schritt ist der Ablösefaktor "R" beteiligt.

Die Formyl-Gruppe des f-meth-Endes des Polypeptids wird von einem spezifischen Enzym entfernt. Nach Freisetzung des fertigen Polypeptids wird auch das Ribosom von der m-RNA freigegeben und dissoziiert offensichtlich in seine 30S- und 50S-Untereinheiten, die dann in einem Untereinheitenpool eingehen, der für weitere Proteinsynthesen bereitsteht.

Alle vorgenannten Reaktionsschritte bei der Proteinbiosynthese beziehen sich auf Untersuchungen an Bakterien, insbesondere E. coli. Die Tatsache jedoch, daß einige Hemmstoffe spezifisch die Proteinbiosynthese entweder von 70S- oder 80S-Ribosomen beeinflussen, läßt aber bereits darauf schließen, daß einige Prozesse an diesen Partikeln im einzelnen beträchtlich von einander abweichen müssen. (137)

3.1.2 Wirkung der Tetracycline auf die Proteinbiosynthese

Viele Antibiotika, wie auch die Tetracycline, verursachen in Säugetierzellen eine Abnahme der Proteinsynthese. Einige Untersucher halten die Störung der Proteinsynthese für die Hauptwirkung der Tetracycline, weil sie die Anlagerung von t-RNA an die Ribosomen hemmen. Übereinstimmende

Befunde wurden an Ribosomen von Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulum gemacht (137, 176, 178, 179).

Im Gegensatz zu den Aminoglycosidantibiotika hemmen die Tetracycline die Proteinsynthese sowohl bei 70S- als auch bei 80S-Ribosomen, obwohl 70S-Ribosomen etwas sensitiver sind. Da Bakterien die Eigenschaft zeigen, die verschiedenen Tetracycline entgegen einem Konzentrationsgradienten in sehr viel stärkerem Maß anzureichern, als z.B. die Leberzellen von Säugetieren, hemmen sie die Proteinsynthese in intakten prokaryotischen Zellen stärker als in eukaryotischen (137, 160, 163, 176, 178, 179). Tetracycline hemmen nicht die Bindung von natürlicher oder synthetischer m-RNA an Ribosomen. Sie sind aber gleichermaßen wirksam auf die Proteinsynthese, unabhängig davon, ob sie von natürlicher oder synthetischer m-RNA gesteuert wird (137).

Untersuchungen über die Wirkung der Tetracycline auf die Wechselwirkung zwischen t-RNA und Ribosom zeigten, daß die Antibiotika die Bindung der Aminoacyl-t-RNA, einschließlich der f-meth-t-RNA, an die Akzeptorstelle des Ribosoms hemmten, die Bindung an die Donorstelle aber nicht beeinflussten (137, 176, 179, 180, 186). Die Bindung von f-meth-t-RNA an das Ribosom wird offenbar von den Tetracyclinen weniger gehemmt (ca. $1/10$) als die Bindung der anderen Aminoacyl-t-RNA's. In einem Modellsystem, das entwickelt wurde, um die Reaktionen der Termination und der Ablösung von N-Formyl-methionin von 70S-Ribosomen, ein Vorgang, der durch die Faktoren "R1" und "R2" stimuliert wird. Das bedeutet, daß die Reaktionen der Termination und der Ablösung an der Akzeptorstelle auf dem Ribosom ablaufen (180). Tetracyclin hemmt tatsächlich die m-RNA gesteuerte Bindung von Aminoacyl-t-RNA an isolierte 30S-Partikel und an ganze Ribosomen (179). Um den Wirkort festzulegen,

wurde radioaktives Tetracyclin eingesetzt. Da das Antibiotikum an die meisten Nukleoproteine bindet, überrascht es sicher nicht, daß es an beide ribosomalen Untereinheiten bindet, allerdings fester an die 30S-Untereinheit als an die 50S-Untereinheit. Der größte Teil des an die Ribosomen gebundenen Tetracyclins ist dissoziierbar; ein kleiner Teil bindet jedoch irreversibel. Nach Behandlung mit bakteriostatischen Tetracyclinkonzentrationen fangen die Bakterienzellen in einem Medium, das kein Antibiotikum enthält, wieder zu wachsen an. Da bis jetzt noch keine gegen Tetracycline resistenten Ribosomen gefunden wurden, ist der tatsächliche Angriffsort für Tetracycline noch nicht mit letzter Sicherheit bestimmbar (137, 160, 179 - 183).

Die Eigenschaft der Tetracycline, mit polyvalenten Kationen Komplexe zu bilden, könnte für die hemmende Wirkung auf die Proteinsynthese mit von Bedeutung sein. Der Gedanke liegt nahe, daß Mg^{2+} -Ionen an den Phosphatgruppen der ribosomalen RNA als Bindeglied zwischen dem Ribosom und den Tetracyclinmolekülen dienen könnten (137).

In vivo müssen offensichtlich Konditionen vorliegen, die verhindern, daß Tetracycline die Mitochondrien-Proteinsynthese inhibieren können. Unter der Therapie mit Tetracyclinen in üblicher Dosierung treten nämlich keine toxischen Schäden an der Leber und an anderen Organen auf. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren (Phenylalanin und Leucin) (179) ergeben, daß durch Erhöhung der Substratkonzentration im Cytoplasma, der Transport der Tetracycline durch die Mitochondrienmembran verhindert wird. Die nur geringe Hemmung der Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums wirkte sich auf den Zellstoffwechsel nicht fühlbar aus. Dennoch kann an Menschen mit eingeschränkter Nierenfunktion oder nach langer und hoher Tetracyclinmedikation der "antianabole" Effekt der Tetracycline in den Vordergrund treten (176).

Eine Ausnahme bildet nur das lipophilste Tetracyclinderivat, Doxycyclin, das zum größten Teil passiv durch die Darmmukosa diffundieren kann, und aufgrund der schlechteren Resorptionsverhältnisse im unteren Dün- und Dickdarm mit den Faeces ausgeschieden wird (167).

Ein solcher toxischer Effekt der Tetracycline äußert sich in einer diffusen Leberverfettung, als Ausdruck einer gestörten Fettsäureoxidation (172) und einer allgemeinen Proteinsynthesehemmung (137), wie auch in einer Abnahme von ATP (171 - 177). Ein gleichzeitiger Anstieg des Stickstoff- und Phosphatspiegels sind weitere Folgen (176). Auch ein dehydrierender Effekt durch signifikanten Na^+ - und Wasserverlust unter Tetracyclinmedikation mit der Entstehung einer Hypovolämie und einer verringerten glomerulären Filtrationsrate wurde beobachtet (176, 184). Bei eingeschränkter Nierenfunktion kann sich in der Folgezeit eine Azidose bilden. Alles in allem entwickelt sich unter einer toxischen Tetracyclindosierung ein lebensbedrohliches klinisches Bild (176, 184).

3.2.1 Wirkungsweise der Tetracycline auf die Mitochondrien

Mitochondrien besitzen ein komplettes genetisches System der Informationsübertragung. Sie verfügen über eine eigene ringförmige DNA, eine DNA-Synthese, eine RNA-Synthese und eine eigene Proteinsynthese (164). Gegenüber dem Cytoplasma sind die Mitochondrien durch eine Doppelmembran abgegrenzt, die den Charakter einer Diffusionsbarriere hat (164). Diese Membran ist impermeabel für Citrat, Isocitrat, Glutamat, NAD, NADH_2 und anorganisches Phosphat, sowie für eine ganze Reihe von Antibiotika, wie Rifampicin, Streptomycin und Erythromycin (165, 166). Die innere Membran, die selbst in flüssigem Zustand vorliegt (165), ist Träger der

Enzyme des Citronensäurezyklus, der oxidativen Phosphorylierung, der Atmungskette, des Abbaus der Fettsäuren und deren Kettenverlängerung, des Abbaus verschiedener Amino- und Ketosäuren, ferner ist sie Träger der Enzyme für die Biosynthese von Phosphatiden, Porphyrinen, Harnstoff und Hippursäure (165).

Die Mitochondrienribosomen aus Säugetierzellen sind sogenannte "Mini"-Ribosomen und zeigen funktionelle Zugehörigkeit zu den 70S-Ribosomen von Bakterien (166). In der Ultrazentrifuge wird für sie eine Svedberg-Konstante von 55 - 60S gemessen (166).

Tetracyclin und Chloramphenicol sind starke Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese bei bakteriostatischen Konzentrationen. Die Stärke der Hemmung nimmt mit der Inkubationsdauer und der Konzentration des Antibiotikums zu (166).

Auf molarer Basis ergibt sich eine etwa gleichstarke Wirkung von Tetracyclin und Chloramphenicol bei Wachstumshemmung und Aminosäureeinbau in der selben Colikultur (166). Bei der zellfreien Proteinsynthese mit Ribosomen und Transferkomplex aus Colizellen des gleichen Stammes zeigt sich jedoch eine sechsfach höhere Sensitivität der 70S-Ribosomen gegenüber Tetracyclin im Vergleich zu Chloramphenicol (166). Überträgt man diese Untersuchungen auf Säugetierzellen, so ergeben sich erhebliche Unterschiede. Bei Annahme einer passiven bidirektionalen Diffusion durch die eukaryotischen Zellmembranen, wie sie für das gegenüber Tetracyclin lipophilere Doxycyclin gilt, ist erst dann mit einer Hemmwirkung auf die mitochondriale Proteinsynthese zu rechnen, wenn eine meßbare Antibiotikumkonzentration im mitochondrialen Raum für eine Störung der Aktivität der 55S-Ribosomen sorgt. Die Stärke dieser Hemmwirkung von Tetracyclin ist eine Funktion des Transports des Antibiotikums durch die Mitochondrienmembran, was sich in einer zeitabhängigen Zunahme der Hemmwirkung

äußert. (166, 168, 169)

Untersuchungen an Mitochondrien von Chondrozyten des knochenbildenden Gewebes von Hühnern, die hohe Dosen von Tetracyclin-HCl erhielten (100 mg/kg KG), ergaben einen hohen Verlust von Ca^{2+} -Ionen, der abhängig von der Tetracyclinkonzentration war. Lag der Tetracyclinspiegel unter 1 mM, ergab sich eine Zunahme der Ca^{2+} -Ionenkonzentration der Organellen. Bei einer Konzentration von 1mM Tetracyclin ergaben sich keine Veränderungen im Ca^{2+} -Ionengehalt der Mitochondrien. Stieg dagegen der Antibiotikagehalt über den Wert von 1mM Tetracyclin in den Mitochondrien, so erfolgte eine konzentrationsabhängige Ca^{2+} -Ionenabnahme. Gleichzeitig stieg der Ca^{2+} -Ionengehalt des Serums an. Ob dieser Beobachtung die Aktivierung einer durch Tetracyclin induzierten latenten mitochondrialen ATP-ase zugrunde liegt, konnte nicht festgestellt werden. Jedoch wurde bei Abwesenheit von ATP eine bemerkenswerte Abnahme des mitochondrialen Ca^{2+} -Ionengehalts festgestellt. (170)

Weitere Untersuchungen an isolierten Lebermitochondrien von Ratten nach Verabreichung von Chlortetracyclin (CTC) zeigten, daß CTC die Fähigkeit besitzt, die Vergesellschaftung der inneren Mitochondrienmembran mit mehrwertigen Metallkationen sichtbar zu machen (170, 171). Angezeigt wurde dies durch eine Zunahme der CTC-Fluoreszenz bei Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen, welche an die Mitochondrienmembran gebunden waren (174). Der beobachtete Ca^{2+} -Ionenausstrom aus der Membran ins Cytoplasma oder den Extrazellulärraum mit parallellaufender Abnahme der Fluoreszenz in der Membran, wurde als Änderung der Ca^{2+} -Ionenbindung in der Membran gedeutet. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß mit Ca^{2+} -Ionen vorinkubierte Mitochondrien, nach Zugabe von CTC einen steilen Abfall ihres Ca^{2+} -Ionenspiegels erfahren. Ebenso konnte gezeigt werden, daß CTC nur dann in die Mitochondrien eindringen kann, wenn

entweder ein zweiwertiges Kation den gleichen Weg nimmt, oder bereits in der Mitochondrienmembran anwesend ist. Unter anderem tragen diese Befunde zur Erklärung bei, weshalb erst relativ hohe Antibiotikumkan-
konzentrationen im Cytoplasma zu einer Störung in den Mitochondrien führen (170, 171). Schon in relativ frühen Arbeiten über eine Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels durch die verschiedenen Tetracycline wurde auf den protektiven Charakter von Mg^{2+} -Ionen gegenüber tetracyclin-
induzierten Störungen aufmerksam gemacht (172, 173).

Spätere Untersuchungen, wie auch unsere eigenen Beobachtungen, lassen ebenfalls eine solche Interpretation in Erwägung ziehen.

Ferner zeigte sich, daß von Mg^{2+} -Ionen befreite oder verarmte Mitochon-
drien einer größeren Beeinflussung durch Tetracycline unterlagen, als solche Mitochondrien, welche zuvor Mg^{2+} -Ionen in unterschiedlicher Konzentration erhalten hatten; wobei schon Konzentrationen von 2 mM Mg^{2+} -Ionen für einen Schutzeffekt ausreichten (175).

Vorinkubation mit Mg^{2+} -Ionen verhinderte eine Störung in der Atmungs-
kette, der β -Oxidation der Fette (172, 187), der mitochondrialen Proteinsynthese und der Membranstabilität als Ausdruck eines gleich-
bleibenden Ca^{2+} -Ionenspiegels (170 - 173, 175, 176).

3.2.2 Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette durch Tetracycline

In zahlreichen Arbeiten wird von den Tetracyclinen als Hemmstoffen der
oxidativen Phosphorylierung und der mitochondrialen Atmungskette von Zellen unterschiedlicher Organe (Herz, Leber, Dünndarm und knochen-
bildendes System) berichtet (171 - 173, 175 - 177).

Die Hemmwirkung von Tetracyclin wird als dem Oligomycin ähnlich be-
schrieben, was seinen Ausdruck findet in der Hemmung der von ADP

stimulierten Atmung in Gegenwart sowohl von Succinat als auch von Glutamat. Begleitende Messungen des P:O Quotienten zeigten eine Abnahme. Die Elektronenübertragung von Succinat auf den Sauerstoff schien aber nicht gestört zu sein, da Dinitrophenol, als Entkopplersubstanz in der Lage war, die Hemmung der Atmungskette aufzuheben. Anders verhielten sich NADH_2 abhängige Substrate, die nach Dinitrophenolzugabe nur eine geringfügige Wiederherstellung ihrer Oxidation zeigten. Aus diesen Untersuchungsbefunden wurde der Schluß gezogen, daß NADH_2 abhängige Substrate, wie z.B. Glutamat und Pyruvat-Malat, empfindlicher gegenüber dem Angriff des Antibiotikums sein müssen. Eine weitere Schlußfolgerung aus den Experimenten macht die Annahme wahrscheinlich, daß die Tetracycline in die Aktivität der Atmungskette am Ort des Eintritts der von NADH_2 abhängigen Substraten in die Kette und dem Eintritt der Reduktionsäquivalente aus Succinat in die Kette hemmend eingreifen. Aufheben ließ sich die Hemmwirkung der Tetracycline, wenn man vor Gabe des Antibiotikums die Mitochondrien mit Mg^{2+} -Ionen in einer Dosierung ab 2 mM und mehr vorinkubierte. Ein anderes Verhalten zeigten Mitochondrien, auf welche man zuerst Tetracyclin einwirken ließ, und denen erst nach einer kurzen Inkubationszeit Mg^{2+} -Ionen angeboten wurden. Hier ließ sich die Hemmwirkung selbst mit Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen bis zu 8 mM nicht wieder aufheben. Eine Erklärung für dieses Phänomen steht zur Zeit noch aus. (170, 172, 175)

Andere Untersucher (178) fanden bei vergleichenden Untersuchungen von Oxytetracyclin (OTC) und Chloramphenicol, daß beide Substanzen die Bildung von Cytochrom-C-Oxidase in neu gebildeten Zellen von Rattenlebern vollständig unterdrückten. Als minimaler Grenzwert der dabei nicht unterschritten werden durfte, wurde für OTC 6 $\mu\text{g/ml}$ Serum, angegeben. In den Mitochondrien dieser sich regenerierenden Leber wurden

für die spezifische Cytochrom-C-Oxidase eine erniedrigte Aktivität und eine niedrigere Konzentration von Cytochrom a/a_3 als im Vergleichskollektiv gemessen. Absetzen beider Antibiotika führte zur vollkommenen Wiederherstellung der Ausgangswerte. (175, 178)

Messungen der "in vivo"-Spiegel von Adenin-Nukleotiden und Kreatinphosphat im Dünndarmgewebe und der Leber von Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Tetracyclinen zeigten eine signifikante Abnahme beider Parameter (175). Besonders auffallend waren die mit der Abnahme von ATP korrelierenden histochemischen Veränderungen an beiden Geweben. Während man in der Leber eine exzessive Anreicherung von Fett fand, erschienen die Dünndarmzellen dagegen stark in ihrer Struktur verändert. In den Dünndarmzellen wurde aber keine Fettanreicherung beobachtet (175).

3.3. Weitere Beobachtungen der Wirkung von Tetracyclinen auf den Zellstoffwechsel

Im Gegensatz zu früheren Berichten von Caraviá und Cárlek (185) fand de Jonge (175) bei seinen Untersuchungen keinerlei Beeinflussung des Glucoseverbrauches in Dünndarmzellen und in menschlichen Erythrozyten durch die verwendeten Tetracycline. Auch die Laktatproduktion und die Bildung von CO_2 wurden durch die Tetracycline nicht beeinflusst. Für die Messungen wurden Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin in einer Dosierung verwendet, aus der Serumspiegel von 100 - 300 $\mu g / ml$ Serum resultierten. Die Inkubationszeit betrug 30 min . De Jonge deutete die in früheren Arbeiten gefundenen pathologischen Ergebnisse als metabolische Entgleisungsreaktionen einer durch Tetracyclinbehandlung induzierten Fettleber (175).

4. Wirkung von Tetracyclinen auf die Leber und deren Triglyceridstoffwechsel

4.1. Allgemeines

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen von Leberzellschädigungen, nämlich einen voraussagbaren Typus und einen nicht voraussagbaren Typus. Repräsentativ für den voraussagbaren Typ darf die Schädigung durch Tetrachlorkohlenstoff gelten, mit welchem man im Experiment Leberzellschäden von stets gleicher Ausprägung erzeugen kann. Zum nicht voraussagbaren Typ einer Leberschädigung zählen die meisten durch Medikamente verursachten Leberschäden.

Man sucht die Erklärung für die Lebertoxizität der verschiedenen Substanzen entweder in immunologischen Reaktionen oder in besonderen genetischen und umweltbedingten ungewöhnlichen Abläufen enzymatischer Reaktionen in der Leberparenchymzelle zu finden. Oft werden auch beide Vorgänge gemeinsam als Erklärungsmöglichkeit herangezogen. Im grundgenommen dokumentiert eine solche Art der Interpretation nur die eigene Hilflosigkeit in der Beurteilung morphologischer und biochemischer Parameter und ist gleichbedeutend mit dem Eingestehen des Fehlens von präzisen Untersuchungsbefunden.

Genaue Kenntnis von zellulären und molekularen Veränderungen erhält man aber nur im überschaubar angelegten Experiment. Menschenversuche schließen sich aus ethischen Gründen aus. Bleibt also nur der Tierversuch als Modell am lebenden Objekt übrig. Allerdings stimmen nur in wenigen Fällen experimentell erzeugte Krankheitssymptome am Tier mit solchen am Menschen überein.

4.2. Durch Tetracycline induzierte Leberverfettung

Eine Intoxikation am Menschen, welche zwar selten, aber in immer gleicher Ausprägung auftritt, ist die durch verschiedene Tetracycline nach parenteraler Applikation hervorgerufene Leberschädigung. Die Umwandlung der normalen, gesunden Leber über eine Leberverfettung in eine Fettleber erfolgt nach parenteraler Gabe hoher Tetracyclindosen und kann sehr gut durch klinische Erfahrung am Menschen belegt werden. Beobachtungen in dieser Richtung wurden von zahlreichen Klinikern gemacht (188 - 194). An Tieren konnten die gleichen Beobachtungen schon 1951 von Lepper et al. (195) und später von weiteren Forschergruppen (196 - 207) gemacht werden. Popper et al. (207) haben 1965 diese pathologische Umwandlung als ziemlich einzigartig unter den von Medikamenten erzeugten Leberkrankheiten bezeichnet, denn die Leberzellverfettung wird von keiner auffallenden entzündlichen Reaktion begleitet.

Eine vorrangige Rolle am Zustandekommen eines toxischen Effektes der Tetracycline spielen ein hoher Blutspiegel und eine hohe Gewebekonzentration. Wie gezeigt werden konnte, kumulieren Antibiotika dieser Substanzklasse etwa viermal so schnell in der Leber als im Serum (193, 202, 203).

Eine Leberschädigung tritt vor allem auch dann auf, wenn über eine eingeschränkte Nierenfunktion die Ausscheidung exogen zugeführter Tetracycline verzögert oder unmöglich ist. Bei Nichtbeachtung dieser Gegebenheiten führt eine weitere Zufuhr der Tetracycline in Dosen, wie sie für Nierengesunde angegeben werden, über Kumulierung rasch in den toxischen Bereich (210 - 222). Eine Ausnahme bildet nur das Doxy-

cyclin, das über Galle und Darm mit den Faeces vollkommen ausgeschieden werden kann (167, 209, 216). Der gleiche Vorgang spielte eine tragische Rolle beim Tod mehrerer schwangerer Frauen, die zur Behandlung ihrer Pyelonephritis Tetracyclin in hoher Dosierung erhalten hatten (223).

Auch die Zufuhr exzessiv hoher Tetracyclinmengen ab einer Dosis von 2 g/die bis zu mehreren g/die bei sonst normalen Ausscheidungsverhältnissen kann das Auslösungsmoment für einen toxischen Leberschaden sein. Die gleichzeitige Applikation von hepatotoxischen Medikamenten (wie z.B. Methoxyfluran) kann ebenfalls Ursache für Leberparenchymschäden größeren Ausmaßes sein (224, 225, 227).

Untersuchungen von Schenker et al. (203 - 206) aus den letzten Jahren haben sich in erster Linie auf die Erforschung der Pathogenese der durch Tetracycline hervorgerufenen Fettleber beschränkt, und das soll nun Gegenstand eines Überblickes über den gegenwärtigen Stand der Forschungen auf diesem Gebiet sein.

4.3. Pathogenese der durch Tetracycline induzierten Fettleber

Es existieren nur eine beschränkte Anzahl von Mechanismen, bei deren Störung Triglyceride in der Leber kumulieren können (siehe Abb. 5). Hierzu zählen ein vermehrter Einstrom oder eine vermehrte Synthese von Fettsäuren in der Leber, gefolgt von ihrer Veresterung zu Triglyceriden. Als weitere Ursachen für eine Triglyceridkumulation in der Leber werden diskutiert eine verringerte Oxidation oder Ausschleusung der Triglyceride (als VLDL-Komplex) oder aber die Kombination aus beiden Möglichkeiten (226).

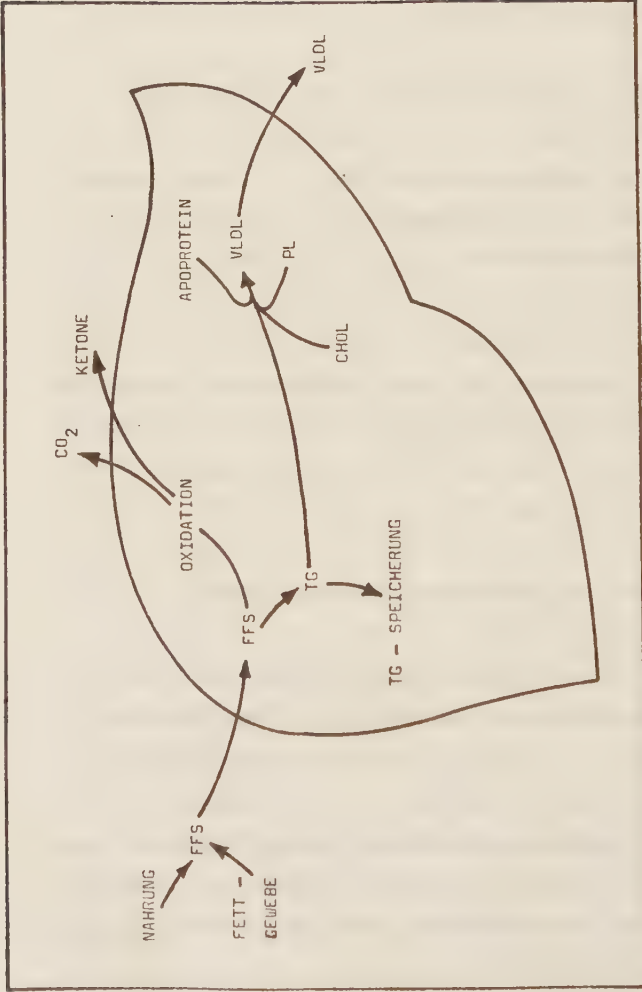


Abb.: 5

Stoffwechselmechanismen, bei denen Störung Triglyceride
in der Leber kumulieren können (nach S. Schenker, K.J.
Braun und m. Heimberg). (226)

Erklärung der Abkürzungen

- FFS = freie Fettsäuren
- TG = Triglycerid
- VLDL = very low density lipoprotein
- PL = Phospholipide
- CHOL = Cholesterin
- CO₂ = Kohlendioxid

Die erste Theorie bezieht sich auf die Beobachtung, daß Tetracycline die oxidative Phosphorylierung in den Lebermitochondrien hemmen, und es dadurch zu einer Abnahme des verfügbaren Energievorrats, in Form von ATP, in der Leber kommt. Solche Veränderungen im Energiestoffwechsel hätten tatsächlich eine Erhöhung der Lebertriglyceride zur Folge. Biochemischer Hintergrund wäre die Hemmung der energieabhängigen β -Oxidation der Triglyceride und freien Fettsäuren oder aber eine verminderte VLDL-Apoprotein-Synthese mit dem Ergebnis eines verminderten Triglyceridabtransportes aus der Leberzelle ins Blut über den VLDL-Komplex.

Die Annahme eine Verringerung von Leber-ATP sei Ursache der Tetracyclintoxizität mit der Folge einer Triglyceridkumulation in der Leber basierte auf Beobachtungen, daß:

- 1) Tetracycline in hoher Dosierung mit der oxidativen Phosphorylierung in einer dem Oligomycin ähnlichen Art und Weise interferierten (170, 172 - 176, 228).
- 2) die Tetracycline in den Mitochondrien von Zellen vieler Organe gefunden wurden (170, 171, 228).
- 3) auch andere Substanzen, welche eine Fettleber verursachen, wie z.B. Äthionin, eine Verringerung oder Unterdrückung der ATP-Bildung in der Leber zeigen (229).

Um nun die Richtigkeit dieser Arbeitshypothese nachzuprüfen, wurde Ratten Tetracyclin verabreicht in einer Dosierung, die ausreichte, um eine Fettleber zu erzeugen. Nach Tötung der Tiere wurde die Leber schockgefroren und später darin ATP mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Methode bestimmt (230). Serienmessungen der Leber-ATP zu verschiedenen Zeiten nach der Tetracyclinbehandlung ergaben keine

Anhaltspunkte für eine Erniedrigung der Nukleotide im Lebergewebe (231). Aus diesen Meßergebnissen wurde ersichtlich, daß die theoretischen Überlegungen, der ATP-Verlust sei Ursache für die Entstehung einer Fettleber, nicht stichhaltig waren.

Aufgrund der gefundenen Ergebnisse wurde die erste Arbeitshypothese verworfen und eine neue aufgestellt. Man ging hierbei von der Überlegung aus, hohe Antibiotikakonzentrationen könnten die Synthese des lebereigenen VLDL-Apoproteins hemmen und über eine verringerte VLDL-Synthese die Ausschleusung der Triglyceride aus der Leber verhindern. Diese zweite Theorie stützte sich auf folgende Beobachtungen:

- 1) Tetracycline sind in der Lage die Proteinsynthese "in vitro" und "in vivo" zu hemmen (137, 160, 163, 176 - 183).
- 2) Die Triglyceride bilden zusammen mit Cholesterin und VLDL-Apoprotein einen Komplex, nämlich VLDL. Fehlt einer der drei essentiellen Bestandteile, z.B. VLDL-Apoprotein, so kann der Komplex nicht gebildet werden und die Triglyceride können auf normalem Wege nicht von der Leber freigesetzt werden (204).

Diese Arbeitshypothese, daß Tetracycline eine verminderte Freisetzung der Triglyceride aus der Leber bewirken, wurde von Ergebnissen, welche auf verschiedenen Wegen gewonnen wurden (195 - 207), weiter gestützt. In einer ersten Versuchsreihe erhielten Ratten, welche gefüttert und nicht gefüttert wurden, Injektionen von Tetracyclin. Sowohl Untersuchungskollektive als auch Kontrollkollektive wurden in gleicher Weise mit Triton behandelt (Triton WR-1339). Triton ist ein nichtionisches Detergens und hemmt die Triglyceridaufnahme vom Blut ins Fettgewebe mit dem Ergebnis, daß die von der Leber freigesetzten Triglyceride sich im Blut anreichern. Die registrierte Abnahme der Hypertriglyceridämie in

Ratten, welche gleichzeitig Tetracyclininjektionen erhielten und mit Triton behandelt wurden, wurde als indirekter Beweis einer verringerten Triglyceridsekretion aus der Leber ins Blut gewertet. Wie aus den von Schenker et al. (203, 226) erhaltenen Meßdaten ersichtlich, waren die Anstiege im Plasmatriglyceridspiegel der mit Triton behandelten Ratten durchwegs und signifikant niedriger in den Untersuchungskollektiven, welche mit Tetracyclin vorbehandelt worden waren, als in den Ratten der Kontrollgruppe, die kein Tetracyclin erhielten (203, 226, 234, 233). Im gleichen Zeitraum zeigten die mit Tetracyclin behandelten Ratten einen signifikanten Anstieg von Triglyceriden in ihrer Leber, der mit der Abnahme der Triglyceride im Blut korrelierte. Ausgehend von diesen Daten wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, die beweisen sollten, daß eine Triglyceridkumulation in der Leber auf einer gehemmten Ausschleusung beruht (203).

Um nun den Mechanismus der Triglyceridkumulation direkt nachzuweisen, wurden verschiedene Studien an der isolierten und perfundierten Leber von gefütterten, männlichen Ratten durchgeführt (206, 226, 234).

In einer ersten Untersuchungsreihe wurden Ratten mit unterschiedlichen Tetracyclindosen infundiert, drei Stunden später die Lebern isoliert und für vier weitere Stunden mit einem Nährmedium perfundiert. Das Nährmedium bestand aus defibrinisiertem Rattenblut, dem Krebs-Bicarbonat-Puffer-Lösung beigemischt war. An Rinderalbumin gebundene Ölsäure wurde mit gleichbleibender Geschwindigkeit während der Dauer des gesamten Experimentes in Form einer Infusion zugegeben. Ähnliche Studien wurden an Ratten vorgenommen, welche intravenöse Injektionen einer auf den Blut-pH eingestellten Lösung von Tetracyclin als einzigem Bestandteil erhielten.

Als erstes Resultat stellte man fest, daß die Fettsäureaufnahme durch die Leber aus dem Perfusat in Ratten, welche 100 mg/kg KG Tetracyclin erhalten hatten, identisch mit der Fettsäureaufnahme der Kontrolltiere war. Perfundierte Rattenlebern von Tieren, welche in vivo Tetracyclindosen von 20, 50, 75, 100 und 150 mg/kg KG erhalten hatten, zeigten um 13, 27, 29, 59 und 92 % höhere Spitzenkonzentrationen ihrer Lebertriglyceride als das Vergleichskollektiv der Kontrollratten (206, 226). Die Triglyceridanreicherung in den mit Tetracyclin behandelten Lebern konnte also nicht durch eine gesteigerte Aufnahme freier Fettsäuren verursacht worden sein. Somit fand die Hypothese, die Ursache der Leberverfettung unter Tetracyclinbehandlung in einer verringerten Triglyceridfreisetzung zu suchen, einen weiteren Anhaltspunkt. Die statistische Berechnung der Triglyceridfreigabe und Triglyceridanreicherung zeigte für ansteigende Tetracyclinkonzentrationen eine lineare, dosisabhängige Beziehung für beide Parameter (205, 206, 226, 234).

In weiteren Studien, in denen Tetracyclin in reiner Form dem Perfusionsmedium zugegeben wurde, zeigten sich wiederum eine Abnahme der Triglyceridsekretion in einer dosisabhängigen Weise gegenüber einem Kontrollkollektiv (226).

Schließlich wurden VLDL, das die Hauptmenge der von der Leber freigesetzten Triglyceride trägt, und LDL durch Zonenzentrifugation vom Leberperfusat abgetrennt und bestimmt (226, 234). Unter der Tetracyclinbehandlung kam es zu einer auffallenden Abnahme der VLDL-Freisetzung um die Hälfte ihres Ausgangswertes, wohingegen sich in der LDL-Konzentration des Perfusats keine Änderungen ergaben.

Zusammengefaßt, deuten alle gewonnenen Daten, sowohl solche, die

direkt an der isolierten, perfundierten Leber, als auch solche, die indirekt mit den Triton-Versuchen gewonnen wurden, auf die Tatsache hin, daß die Hauptursache am Zustandekommen einer Leberverfettung eindeutig in der unterdrückten Triglyceridausschleusung aus den Leberzellen zu suchen ist.

Andere Untersucher verwendeten ^{14}C -markierte Ölsäure (205, 206, 226) in Konzentrationen, mit denen man noch keine maximale Triglyceridsekretion der Hepatocyten erhält. Sie bestätigten anhand ihrer Ergebnisse die richtige Zielsetzung der vorgegebenen Arbeitshypothese. Messungen der Radioaktivität von Ketonkörpern und von CO_2 im Perfusat stimmten mit den auf chemischen Wegen gefundenen Ergebnissen überein und zeigten keine Veränderungen im Einbau des ^{14}C -Atoms aus der Ölsäure in CO_2 und den Ketonkörpern, während der "in vivo"-Untersuchungen. Abweichungen fand man dagegen bei den "in vitro"-Versuchen, wo Tetracyclin dem Perfusat direkt zugesetzt wurde. Hier registrierte man eine etwas geringere Radioaktivität von CO_2 und den Ketonkörpern (206, 226, 235).

Trotz einer gewissen Tetracyclinanreicherung könnte das offensichtliche Fehlen der Abnahme in der Triglyceridfreisetzung aus der Leber bei Verwendung niedriger Tetracyclinkonzentrationen seine Ursache in den zu wenig empfindlichen Meßmethoden zu suchen sein. Es wurden nämlich nur geringe Änderungen der Triglycerid- und freien Fettsäurekonzentration während der Versuche gemessen. Andererseits könnte auch ein anderer noch nicht bekannter Mechanismus für die Lebertriglyceridenreicherung bei Anwendung niedriger Tetracyclinkonzentrationen in Frage kommen (226). Auch das Zusammenspielen mehrerer Prozesse ist hierbei in Erwägung zu ziehen (z.B. Störung der Proteinbiosynthese im Cytoplasma und in den Mitochondrien kommt aufgrund einer fast vollständigen Bindung an Pro-

teine des Cytosols nicht zum Tragen; Komplexierung mit Kationen oder Anionen des Cytosols führt zur Aufhebung der für die Toxizität der Tetracycline verantwortlichen Wirkung u.a.m.) (226).

Als weitere Möglichkeit zur Erklärung einer fehlenden Tetracyclintoxizität mit niederen Dosen käme die Bindung des Antibiotikums an Ligandin in Betracht (232, 238). Dieses niedermolekulare, in flüssiger Form im Cytoplasma von Leberzellen vorliegende Protein besitzt nämlich die Fähigkeit Substanzen mit dem Charakter schwacher Säuren, wie z.B. die Tetracycline, Chloramphenicol, Penicilline oder Cephalosporine u.a.m., zu binden, und so deren Konzentrationen an freier Säure, welche für die Ausprägung eines toxischen Effektes maßgeblich ist, zu senken (232, 238). Eine andere Erklärungsmöglichkeit mag auch in der Eigenschaft der Tetracycline selbst begründet sein, da diese Antibiotikaklasse eine starke Affinität zu den Serumalbuminen zeigt. Durch eine solche Bindung würde sich die Konzentration an freiem Antibiotikum ebenfalls beträchtlich erniedrigen (208, 209, 167).

4.4. Zusammenstellung der toxischen Tetracyclinwirkungen auf die Zellen

- 1) Als Hauptwirkung steht die Hemmung der Proteinsynthese im Vordergrund der Betrachtungen, wobei die 70S-Ribosomen von Bakterien und die zur gleichen Klasse zählenden 55S-Ribosomen von Mitochondrien ca. 20-mal sensitiver gegenüber Tetracyclin reagieren als die 80S-Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums von Säugetierzellen. Angriffspunkt ist dabei die Hemmung der Anlagerung von Amino-acyl-t-RNA an die Akzeptorstelle des Ribosoms.
- 2) Die Hemmung der ATP-Bildung durch eine dem Oligomycin ähnliche Wirkung der Tetracycline scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, NADH_2 -abhängige Substrate werden in der Atmungskette durch Tetracycline stärker beeinflusst als frei eintretende Substrate, wie z.B. Succinat.
- 3) Veränderungen in der Stabilität von Mitochondrienmembranen sind abhängig von der Antibiotikakonzentration. Sie sind gekennzeichnet durch einen starken Ca^{2+} -Ionenverlust der Mitochondrien.
- 4) Eine teilweise Hemmung der β -Oxidation von Fetten kommt wohl über eine Hemmung der Proteinbiosynthese zustande.
- 5) Auch die Kumulierung von Triglyceriden in der Leber ist offenbar die Folge einer gehemmten Proteinbiosynthese.

4.5. Pathohistologische Studien zur toxischen Tetracyclinwirkung

Eine Forschergruppe um Gray (202) untersuchte 1974 mit Licht- und Elektronenmikroskop die frühen und aufeinanderfolgenden Veränderungen in der Leberarchitektur nach Tetracyclinapplikation. Als Experimentiermaterial wählten sie weibliche, männliche und trächtige Ratten. Nach intravenöser Gabe von Tetracyclin-HCl (TC-HCl) bis zu einer Grenzdosis von 300 mg/kg KG reicherten sich Fetttröpfchen im Dissé-schen Raum an, wohingegen die intravenöse Applikation von 100 mg/kg KG TC-HCl nur eine Leberverfettung induzierte. In den mit 100 mg/kg KG TC-HCl behandelten Ratten fanden sie eine charakteristische Fetttröpfchenansammlung in den Hepatocyten entlang der Zellgrenze zu den Sinusoiden. Während der ersten 24 Stunden nahm die Anzahl der Tröpfchen und auch deren Größe allmählich zu. Diese Zunahme erfolgte überall in den Läppchen. Eine selektive, insbesondere zentrilobuläre Kumulation fiel hierbei nicht auf. Nach fünftägiger Verabreichung von 100 mg/kg KG TC-HCl nahm die Tröpfchengröße weiter zu und erreichte Durchmesser von 75 μ m und mehr. Die Zellkerne waren zur Seite hin verlagert. Andere lichtmikroskopische Veränderungen konnten nicht beobachtet werden. Ein ungewöhnlicher Blutandrang in den Sinusoiden wurde ebenfalls nicht bemerkt.

Etwas anders verhielt es sich mit den Lebern von Ratten, welche 300 mg/kg KG TC-HCl pro Tag erhielten. Das früheste Auftreten kleinster Fetttröpfchen wurde erst 6 - 8 Stunden nach Injektion von TC registriert. Zur gleichen Zeit beobachtete man in vereinzelter Hepatocyten ein verstärktes Auftreten von Fetttröpfchen in subsinusoidaler Position. Nach 24 Stunden setzte sich dieser Trend fort. Man fand ein

charakteristisches Verteilungsmuster der Fetttröpfchen in subsinusoidal Lage. Es trat gleichzeitig und gleichmäßig in allen Leberläppchen auf. Auch in den Hepatocyten selbst wurden Tröpfchen festgestellt. Sie hatten aber einen geringeren Umfang als jene nach Verabreichung von 100 mg/kg KG TC-HCl. Nach insgesamt drei Behandlungstagen hoben sich die Sinusoide immer schärfer von einer dichter werdenden Zone feiner Fetttröpfchen ab. Im gleichen Zeitraum verschmolzen viele kleine Fetttröpfchen miteinander und bildeten zusammen größere Tropfen bis hin zu kleinen Fettseen. Diese Vorgänge beobachtete man sowohl in den Hepatocyten als im Disséschen Raum.

Als Ergebnis gleichzeitig durchgeführter Fluoreszenzmessungen fand man eine gleichmäßige TC-Verteilung; sowohl in den Hepatocyten als auch in Fetttröpfchen des Disséschen Raumes konnten keine auffälligen Tetracyclinanreicherungen festgestellt werden.

Verfeinerte elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die mit dem Lichtmikroskop gewonnenen Erkenntnisse der Veränderungen in der Leber von Ratten, welche eine tägliche Testdosis von 100 mg/kg KG TC-HCl erhalten hatten. Etwa 6 Stunden nach der ersten Behandlungsdosis wurde eine vorübergehende Schwellung der Mitochondrien beobachtet. Im weiteren Verlauf des Versuchs schien die Ausdehnung des rauen Endoplasmatischen Retikulums abzunehmen, obwohl weder eine Dilatation noch eine Fragmentierung des Endoplasmatischen Retikulums festgestellt werden konnte. Die Kupfferschen Sternzellen und die Fett produzierenden Ito-Zellen veränderten während der Versuchsdauer ihr Aussehen nicht. Andere Vorgänge beobachtete man dagegen in den Lebern von Ratten, welche 300 mg/kg KG TC-HCl als Testdosis erhalten hatten. Innerhalb der ersten 24 Stunden nahm die Anzahl der Fetttröpfchen zu; sie verschmolzen in

In diesem Zeitraum zu größeren Tröpfchen und drängten das Cytoplasma so stark an den Rand der Zellen, daß es unmöglich wurde die Zellgrenzen zu bestimmen. Die Zelloberflächen der Hepatocyten zeigten ektoplasmatische Ausstülpungen, welche Fetttröpfchen umhüllten und einzelne Ribosomen enthielten. Die Fetttröpfchen selber schienen keine begrenzende Membran zu besitzen. Das gleiche traf auf die Fetttröpfchen des Disséschen Raumes zu; jene Fetttröpfchen schienen durch austretende Liposomen entstanden zu sein und wuchsen durch Verschmelzung einzelner Fetttröpfchen, sobald diese die Zellgrenze überschritten hatten. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes fielen immer wieder vereinzelt Zellen auf, deren Mitochondrien angeschwollen waren und ein körniges Aussehen hatten. Die Cristae waren dilatiert und lagen als Fragmente vor. Die äußere Mitochondrienmembran war häufig verzogen und auch sogenannte "Mitochondrienleichen" waren zu sehen. Die sonst wie aufgestapelt imponierenden Schläuche des Endoplasmatischen Retikulums waren zerrissen oder sogar völlig verschwunden. Klumpen waren erkennbar und konnten, als aus zusammengebackenen Ribosomen entstanden, identifiziert werden. Innerhalb der Mitochondrien waren jedoch immer noch einzelne, wie Adern erscheinende, intakte Ribosomenstränge erkennbar. Die Kanäle des glatten Endoplasmatischen Retikulums waren enorm dilatiert und enthielten kleine Fetttröpfchen. Auch die Aktivitäten des Golgi-Apparates schienen an der Bildung feiner Tröpfchen beteiligt zu sein. Am Zellkern jedoch konnten während der gesamten Versuchsdauer keine Auffälligkeiten entdeckt werden. (202)

Konzentrationsbestimmungen mit Tritium markierter Palmitinsäure (202) zeigten keine Minderung ihrer Aufnahme in die Hepatocyten. Nach intravenöser Injektion von 300 mg/kg KG TC-HCl war die Tetracyclinkonzen-

tration nach einer Stunde in der Leber zehnmal höher als zum gleichen Zeitpunkt im Serum. Im Verlauf von fünf weiteren Stunden stieg die Leberkonzentration von Tetracyclin von nahezu 300 $\mu\text{g/g}$ auf 800 $\mu\text{g/g}$ Leber an (202). Dagegen wurden innerhalb des Zeitraumes von 48 Stunden nach intravenöser TC-Applikation von 100 mg/kg KG keine Gewebespiegel über 200 $\mu\text{g/g}$ Leber gemessen (202).

Unter "in vitro"-Bedingungen präzipitierte TC-HCl die β -Lipoproteinfraktion des Serums erst, wenn Spiegel über 200 $\mu\text{g/ml}$ Serum erreicht wurden (238). Gray et al. (202) postulierten unter der Voraussetzung, daß sobald die Gewebekonzentration von Tetracyclin den Wert von 200 $\mu\text{g/g}$ Leber überschreite, sich das intrazellulär befindliche Tetracyclin augenblicklich mit der LDL-Fraktion der Hepatocyten verbinden und ein Präcipitat bilden würde. In der Tat wurde der präcipitierte TC-LDL-Komplex in der gleichen Art und Weise in das Kanalsystem des dilatierten glatten Endoplasmatischen Retikulums ausgeschleust, wie die Liposomen aus der Zelloberfläche in den Sinusoidalraum. Der Vesikelinhalt entleerte sich in den Disséschen Raum, wo er in Form kleiner und größerer Tröpfchen abgelagert wurde. Innerhalb kurzer Zeit zeigten dann die Hepatocyten einen Verlust von Mikrovilli an ihrer Oberfläche, und der Dissésche Raum blähte sich immer stärker auf. Nur wenige der mit 300 mg/kg KG TC-HCl behandelten Ratten überlebten das Experiment länger als drei Tage (202).

Als Minimalspiegel zur Erzeugung toxischer Veränderungen an der Leber geben Farhat et al. (199) einen Serumspegel von 20 $\mu\text{g/ml}$ Serum an Tetracyclin an.

Zusammenfassend kann man drei aufeinanderfolgende Stadien der Leberveränderungen mit steigenden Tetracyclinkonzentrationen beobachten:

- 1) Zuerst treten zahlreiche kleinere und größere Fetttröpfchen in den Hepatocyten auf,
- 2) anschließend bilden kleinere Tröpfchen durch ihr Zusammenfließen größere Tropfen und sogar Fettseen,
- 3) und im letzten oder Finalstadium kommt es zum Zelluntergang der Hepatocyten mit ihren vielfältigen Erscheinungsformen.

(201)

5. Eigene Untersuchungen:

Vergleichende Messungen der Veränderungen im Triglyceridspiegel von Serum und Leber bei männlichen Mäusen nach Gabe einer einmaligen intravenösen Injektion von Tetracyclin-HCl (TC), Pyrrolidinomethyl-tetracyclin (PMT) und Doxycyclin (DC) in steigenden Konzentrationen und nach verschiedener Einwirkungsdauer

5.0. Einleitung

Wie an anderer Stelle bereits ausgeführt, fiel bei pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen der ersten Vertreter aus der Tetracyclinreihe, deren hepatotoxische Wirkung auf (Lepper et al., 1951) (191).

Zahlreiche spätere Arbeiten, die sich mit dieser Thematik befaßt haben, lassen aber vergleichende Untersuchungen der in der Praxis und Klinik gebräuchlichsten Tetracyclinderivate: Tetracyclin-HCl (TC)

Doxycyclin (DC)

Pyrrolidinomethyl-tetracyclin
(PMT)

vermissen; u.a. fehlen vergleichende Messungen der Gesamttriglyceride in Serum und Leber nach einmaliger intravenöser Injektion der vorgenannten drei Antibiotika in steigenden Konzentrationen und nach verschiedenen Zeitabständen, als Indikatorsubstrate für das Auftreten einer hepatotoxischen Wirkung der Tetracycline. Bei Zu- oder Abnahme der Gesamttriglyceride in Serum und Leber muß auch mit weiteren toxischen Wirkungen auf den gesamten Organismus gerechnet werden.

Erste Ansätze in dieser Richtung wurden von Schenker et al. (226) in den letzten Jahren unternommen. Die vorliegende Arbeit soll eine dieser Lücken schließen helfen.

5.1. Methodik

5.1.1 Versuchstiere und Behandlung

Für alle Untersuchungen wurden männliche NMRI Mäuse im Gewicht von 20 - 28 g verwendet. Die Durchschnittswerte der Gewichte der Tiergruppen sind aus den Tabellen 3 - 11 ersichtlich. Die Tiere wurden in Gruppen von 6 - 12 Tieren in Plastikkäfigen mit Sägespäneinstreu bei einer Raumtemperatur von 25°C gehalten. Sie wurden mit Standardfutter (Fuko) und Leitungswasser ad libitum gefüttert.

Alle Tests wurden im Juni/Juli durchgeführt, mit Ausnahme der 48 und 72 Stundentests, die im Januar gestartet wurden.

Als Testsubstanzen wählten wir:

- 1) Tetracyclin-HCl (Fa. Hoechst)
- 2) Pyrrolidinomethyl-tetracyclin (Fa. Hoechst)
- 3) Doxycyclin (Fa. Pfizer)

die uns von den in Klammern bezeichneten Firmen freundlicherweise unentgeltlich zur Verfügung gestellt wurden.

Vor Beginn des Forschungsprogramms wurden die Tetracyclinderivate chromatographisch auf Abwesenheit von unerwünschten Zerfallsprodukten geprüft.

Die Antibiotika wurden jeweils unmittelbar vor den Injektionen in einer 1,5 mmol MgSO_4 -Lösung aufgelöst. Die Antibiotikakonzentrationen betrugen 1 000 $\mu\text{g/ml}$, 2 500 $\mu\text{g/ml}$, 5 000 $\mu\text{g/ml}$ und 10 000 $\mu\text{g/ml}$ Lösung.

Die Tiere erhielten eine einmalige intravenöse Injektion dieser Antibiotikallösungen in eine Schwanzvene, und zwar erhielten die Mäuse pro g Körpergewicht Antibiotikadosen von 10, 25, 50 und 100 μg . Die Injektionen wurden stets am Morgen zwischen 8⁰⁰ - 10⁰⁰ vorgenommen. Nach 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet.

Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen 1,5 mmol MgSO_4 -Lösung. Alle Antibiotikadosen lagen unter der Letalitätsgrenze; dennoch starben uns 4 Tiere bei Injektion von 100 $\mu\text{g/g}$ KG PMT vermutlich wegen zu schneller Injektion. Bei langsamerer Spritztechnik wurden während der weiteren Untersuchungen keine Todesfälle mehr beobachtet.

Pro Dosis und Zeit wurden in der Regel 10 Tiere für die Versuche eingesetzt. Für die Kontrollgruppen gilt entsprechendes. Die exakten Angaben über Zahl der zur statistischen Auswertung eingesetzten Tiere sind den Beschreibungen der Abb.: 6 - 14 zu entnehmen.

5.1.2 Aufarbeitung von Blut und Organen

Das bei der Dekapitation gesammelte Blut wurde sofort zentrifugiert und das gewonnene Serum zur Bestimmung der Gesamtriglyceride verwendet. Unmittelbar nach dem Ausbluten der Tiere wurde die Leber herauspräpariert und sofort in flüssiger Luft schockgefroren und bei einer Temperatur von minus 70°C für die spätere Aufarbeitung eingelagert.

1 Teil Leber wurde mit 9 Teilen physiologischer Kochsalzlösung versetzt und während 1 Minute bei 20 000 U/min mit einem Stabhomogenisator des Typs "Ultra-Turrax^R" (Fa. Janke & Kunkel KG, IKA-Werk, D-7813 Staufen, Typ "TP 18/10") zerkleinert. Ein Teil des Homogeni-

sats wurde aufgehoben und in ihm die Gesamttriglyceride bestimmt.

5.1.3 Triglyceridbestimmung

Die Triglyceride wurden vollenzymatisch in Halbmikrotechnik nach der modifizierten Methodik von A.W.Wahlefeld (239) mit dem Testsatz der Fa. Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica bei 340 nm am Zeiss-Photometer vom Typ PM 6 gemessen. Die in den Tab.: 3 - 11 in den Beschreibungen zu den Abb.: 6 - 14 angegebenen Meßwerte beziehen sich auf mg/100 ml Serum und mg/g frischpräparierter Leber. Die Meßergebnisse der Serumwerte wurden um den Wert von 10 mg/ 100 ml Serum für das freie Glycerin bereinigt.

5.2. Berechnung der Meßwerte

Die Einzelergebnisse der Meßgruppen wurden statistisch mit Hilfe der Varianzanalyse ausgewertet und die Signifikanz mit Hilfe der Formel von Scheffé ermittelt. Als Signifikanzgrenze für Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

$$\text{Formel von Scheffé: } F_{ij} = \frac{(x_i - x_j)^2}{(t - 1) M_{j(i)}} \cdot \frac{n_i \cdot n_j}{n_i + n_j}$$

x_i = Mittelwert der Messungen der behandelten Tiergruppe

x_j = Mittelwert der Messungen der Kontrolltiergruppe

t = Anzahl der Untersuchungsgruppen in der Varianzanalyse

n = Anzahl der Tiere in einer Gruppe

$M_{j(i)}$ = Durchschnittsquadrat der zu berechnender Untersuchungsgruppe

5. Ergebnisse der Tierversuche

5.3. Serum - Triglyceride

5.3.1 Tetracyclin-HCl (siehe Tab.: 3 und Abb.: 6)

Nach zwei Stunden wurde eine ansteigende Triglyceridkonzentration im Serum gemessen, wobei der Gipfelwert in der Gruppe lag, die 50 mg/kg KG erhalten hatte. Nach vier Stunden wurden in etwa die Ausgangswerte wieder erreicht. Ab acht Stunden post injectionem nahmen die Triglyceride im Serum kontinuierlich ab und lagen zum Teil erheblich unter den Werten der Kontrollgruppe. Für alle Gruppen ergab sich eine zeitabhängige Abnahme der Serumtriglyceride (Abb.:6). Die größte Abnahme wurde in der mit 100 mg/kg KG vorbehandelten Gruppe gemessen; die Veränderungen waren jedoch in keinem Fall statistisch signifikant.

5.3.2 Doxycyclin (siehe Tab.: 4 und Abb.: 7)

In der Doxycyclin-Gruppe konnte kein Trend wie in der Tetracyclin-Gruppe festgestellt werden. Hier schwankten die Meßwerte stets um den Kontrollwert ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe gefunden werden.

5.3.3 Pyrrolidinomethyl-tetracyclin (siehe Tab.: 5 + 6 und Abb.: 8 + 9)

In den Untersuchungsgruppen, welche mit PMT behandelt worden waren,

konnten ebenfalls keine signifikanten Triglyceridab- oder -zunahmen gefunden werden. Die Meßwerte schwankten nur gering um den Wert der Kontrollgruppe. Ein Zusammenhang von Tetracyclindosis und Triglyceridspiegel des Serums war nicht erkennbar.

5.4. Leber - Triglyceride

5.4.1 Tetracyclin-HCl (siehe Tab.: 7 und Abb.: 10)

Während zwei Stunden nach der Tetracyclingabe in allen Gruppen eine schwache Abnahme der Lebertriglyceridkonzentration gefunden werden konnte, zeigten die Meßwerte der Gruppen mit 10, 25 und 50 mg/kg KG zu den späteren Meßzeitpunkten wieder normale Werte mit nur geringen Schwankungen um den Wert der Kontrollgruppe. Anders verhielt es sich mit der Gruppe, welche eine Dosis von 100 mg/kg KG erhalten hatte. Hier wurde bis zur 24. Stunde eine kontinuierliche Zunahme der Triglyceridwerte in den Lebern gefunden. Nach 48 Stunden lag der Triglyceridgehalt der Leber im Bereich der Normwerte (in Tab.: 7 und Abb.: 10 nicht aufgeführt). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten die Gruppen mit 100 mg/kg KG nach 8 und 24 Stunden, sowie der Zweistundenwert in der Gruppe mit 10 mg/kg KG .

5.4.2 Doxycyclin (siehe Tab.: 8 + 9 und Abb.: 11 + 12)

Alle Untersuchungsgruppen zeigten über den Zeitraum von 72 Stunden nur geringe Abweichungen vom Kontrollwert. Signifikante Unterschiede fanden sich nur bei den mit 25 mg/kg KG vorbehandelten Tieren im 48 - Stundenwert und in der Gruppe mit 100 mg/kg KG nach 4 Stunden.

Die gefundenen Abweichungen dürften trotz statistischer Signifikanz im physiologischen Spielraum liegen.

5.4.3 Pyrrrolidinomethyl-tetracyclin (siehe Tab.: 10 + 11 und Abb.: 13 + 14)

Auch der Einfluß von PMT auf den Fettstoffwechsel der Leber war offensichtlich gering. Eine signifikante Abweichung vom Kontrollkollektiv zeigte wie schon beim Doxycyclin nur der Wert nach 4 Stunden bei den Tieren, welche zuvor 100 mg/kg KG erhalten hatten. Insgesamt gesehen waren die Schwankungen im Triglyceridspiegel der Leber noch geringer als bei den beiden anderen Tetracyclinderivaten.

5.5. Diskussion

Eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Triglyceride im Serum und ein dazu parallellaufender Anstieg der Triglyceride in der Leber nach einmaliger intravenöser Applikation konnte von uns nur beim Tetracyclin-HCl in einer Dosierung von 100 mg/kg KG in Übereinstimmung mit anderen Autoren (195 - 207, 226, 233, 234) beobachtet werden. Die Angaben von Farhat et al. (199), daß zur Erzeugung toxischer Veränderungen in der Leber ein Minimalspiegel von 20 µg/ml Serum benötigt wird, bezieht sich offensichtlich nur auf das Tetracyclin-HCl. Die von uns gefundene Verschiebung der Toxizitätsgrenze auf höhere Dosen von Tetracyclin-HCl ist zum einen bedingt durch die erst stattfindende Verteilung der intravenös applizierten Testdosis im Blut und in den Geweben und zum anderen wohl auf den in früheren Arbeiten (170 - 173, 175, 176, 187) bereits angeklungenen protektiven Charakter der Mg^{2+} -Ionen, die in unserem Lösungsmittel in 1,5 mMol enthalten waren.

Mg^{2+} -Ionen bilden mit den Tetracyclinen Chelate, die zu groß für den Membrantransport sind (46) und zugleich nimmt die Serumbindung mit steigender Mg^{2+} -Konzentration zu (76). Die Komplexbildung hängt von der Natur der Ladung des Kations sowie vom pH-Wert der Lösung ab. Als pK_a -Konstanten werden für Tetracyclin-HCl angegeben:

$$pK_{a1} = 3.3 \quad (C_1 - C_2 - C_3 - \text{Tricarbonyl-methan-System})$$

$$pK_{a2} = 7.8 \quad (C_{11} - E_{12\beta} - \text{Diketon-System})$$

$$pK_{a3} = 9.5 \quad (\text{Deprotonierung von } C_4 - \text{Dimethylammonium-Ion})$$

Mit Mg^{2+} -Ionen bildet Tetracyclin-HCl erst oberhalb von pH = 7,0 ein Chelat zwischen der 5- und 12a-Hydroxygruppe (246). Eine Bindungskonstante wird dafür leider nicht angegeben.

Das bedeutet in praxi, daß weniger Wirkungsäquivalente von freiem Tetracyclin-HCl für die Ausbildung seiner Toxizität in der Zelle zur Verfügung stehen. Auch der transmembrale Transport von intravenös angebotenen Mg^{2+} -Ionen und deren Anreicherung im Cytosol der Zellen könnte zur Erklärung einer Verschiebung der Toxizitätsgrenze nach höheren Dosen von Tetracyclin-HCl (100 mg/kg KG) herangezogen werden. Diskutiert wird nämlich von Franklin und Snow (137) die Interaktion von an ribosomalen Phosphatgruppen gebundenen Mg^{2+} -Ionen mit den Tetracyclinen als möglicher Ansatzpunkt für die Inhibierung der Proteinsynthese. Wie bereits auf Seite 31 ff. ausgeführt, verhindert die Vorinkubation von Versuchstieren mit Mg^{2+} -Ionen eine Störung in deren Synthese von VLDL-Apoprotein im endoplasmatischen Retikulum (226), Atmungskette, β -Oxidation der Fette (172, 187), mitochondrialer Proteinsynthese und mitochondrialer Membranstabilität (170 - 173, 175, 176).

Anders als das Tetracyclin-HCl erreichte das langsam aus Pyrrolidinomethyl-tetracyclin durch hydrolytische Spaltung freiwerdende Tetra-

cyclin in unseren Versuchen nicht die kritische Konzentration von 100 mg/kg KG und war deshalb auch nicht in der Lage seine Toxizität zu entwickeln. Das lipophilere Doxycyclin ließ, wie schon in früheren Arbeiten angemerkt, keine toxische Wirkung auf den Lebertriglyceridstoffwechsel erkennen, obwohl es den für die Praxis gebräuchlichen Dosisbereich in unseren Versuchen erheblich überschritt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von de Jonge (175) fanden wir in unseren Versuchen keine erhöhte Toxizität von Doxycyclin im Vergleich mit den anderen Tetracyclinderivaten. Das mag, ohne im Widerspruch zu den Ergebnissen von de Jonge zu stehen, daran liegen, daß auch hier die im Lösungsmittel enthaltenen Mg^{2+} -Ionen ihren toxizitätsdepressiven Einfluß entwickelten. Frühere Arbeiten, welche sich mit der Komplexierung von Tetracyclinderivaten beschäftigten, fanden die größte Zunahme der Komplexierung bei Doxycyclin, die kleinste bei Oxytetracyclin (9, 76). Um nun eine definitive Beurteilung der Wirkung von Mg^{2+} -Ionen auf die Toxizität von Tetracyclinen geben zu können, müßten die Konzentrationen der Mg^{2+} -Tetracyclin-Chelate im Serum und in den Geweben (d.h. Zellen) gemessen werden. Auch die mikrobiologische Wirksamkeit von Mg^{2+} -Tetracyclin-Komplexen müßte in ein solches Untersuchungsprogramm mit eingeschlossen werden. Entsprechende Versuche laufen zur Zeit im Rahmen eines Forschungsauftrags der DFG an unserem Institut.

Für die Entstehung einer tetracyclininduzierten Leberverfettung, auch wie sie in den eigenen Versuchen nach Tetracyclin-HCl gefunden wurde, werden in mehreren Arbeiten verschiedene Mechanismen diskutiert, die nicht isoliert sondern nur in ihrer Gesamtheit betrachtet werden dürfen. Ausgangspunkt für alle Überlegungen und Untersuchungen stellt die generelle Inhibierung der Proteinsynthese durch alle Tetracyclinderivate dar. Davon sind sowohl die cytoplasmatische als auch die mitochondriale

Proteinsynthese betroffen. Zahlreiche Enzyme und Enzymsysteme sind von der verringerten Syntheseleistung der durch die Tetracycline inhibierten Ribosomen betroffen. Insbesondere aber jene, welche aufgrund ihrer hohen Stoffwechselrate schneller nachgebildet werden müssen als jene, die nur in geringem Maß am Stoffwechselgeschehen beteiligt sind oder in inaktiver Form in der Zelle bereitliegen. Untersucht wurden bisher die Suppression der Fettsäureoxidase durch Chlortetracyclin (172), die Abnahme der Aktivität von spezifischer Cytochrom-C-Oxidase und von Cytochrom aa_3 nach Applikation von Oxytetracyclin (178), mit dem Resultat einer Abnahme von ATP und des P:O Quotienten und der Anreicherung von Substraten, die über $NADH_2$ in der Atmungskette oxidativ abgebaut werden (171 - 173, 175 - 179). Im Widerspruch dazu stehen Serienmessungen von Leber-ATP zu verschiedenen Zeiten nach Tetracyclinbehandlung. Sie wurden durchgeführt von Schenker et al. (230) und Lewis et al. (231), die keine Anhaltspunkte für eine Erniedrigung der Nukleotide im Lebergewebe fanden. Beide Forschergruppen schließen aufgrund ihrer Ergebnisse, daß der beschriebene ATP-Verlust nicht die Ursache für die Entstehung einer Fettleber sein kann, sondern allenfalls als sekundäre Folge der antianabolen Wirkung der Tetracycline in Frage kommen könnte.

Als weitere Ursache für die Triglyceridkumulation in der Leber wird eine verringerte Ausschleusung der Triglyceride als VLDL-Komplex diskutiert. VLDL trägt die Hauptmenge der von der Leber freigesetzten Triglyceride (226, 234). Die bisher am besten fundierte Hypothese, die von Schenker (226) aufgestellt wurde, spricht für eine verringerte Synthese des am VLDL-Komplex beteiligten Apoproteins in der Leber durch die Tetracycline, wobei die einzelnen Tetracyclinderivate ein unterschiedliches Verhaltensmuster zeigen. Deshalb ist es nicht

zulässig die gefundenen Ergebnisse eines Tetracyclinderivats kritiklos auf alle anderen Derivate zu übertragen.

Andere Autoren wiesen eine Beteiligung von Ligandin, einem Gemisch von verschiedenen Glutathion-S-Transferase-Enzymen, an der zellulären Bindung und eventuellen Inaktivierung von Tetracyclinen in der Leberzelle nach (232, 238, 247 - 249).

Parallele Untersuchungen im Rahmen einer Dissertation für das Fach Medizin über die Abhängigkeit von GOT und GPT im Serum derselben Tiere, die auch meiner Arbeit zugrundeliegen, durchgeführt von Frau Pfandzelter, zeigten eine auffallende Übereinstimmung der Signifikanzen für S-GOT und der Signifikanzen für die Triglyceride bei deren Bestimmung in der Leber. Auch Frau Pfandzelter fand für Tetracyclin-HCl bei den Werten nach 8 und 24 Stunden und einer Dosierung von 100 mg/kg KG signifikante Anstiege im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Die S-GPT-Werte zeigten schon bei 2 Stunden bei gleicher Tetracyclindosierung von 100 mg/kg KG einen signifikanten Anstieg, der bis zum 8-Stundenwert anhielt und erst nach 24 Stunden wieder auf fast normale Werte zurückkehrte. Aus diesen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß S-GPT empfindlicher und früher auf Tetracyclin-HCl reagiert als S-GOT; andererseits aber der S-GOT-Anstieg im Blut parallellläuft mit der Triglyceridkumulation in der Leber und der Triglyceridabnahme im Serum. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch beim Pyrrolidinomethyl-tetracyclin. Abweichende Ergebnisse fanden sich nur beim Doxycyclin. Hier fand Frau Pfandzelter für S-GOT erst nach 8 Stunden und für S-GPT nach 2 und 8 Stunden signifikante Anstiege für die Dosierung von 100 mg/kg KG Doxycyclin. Die Lebertriglyceride zeigten dagegen nur im 4-Stundenwert bei gleicher Dosierung einen signifikanten Anstieg. Die Triglyceridwerte des Serums

zeigten nur leichte Schwankungen um den Kontrollwert. Wie für das Tetracyclin-HCl traf auch für Pyrrolidinomethyl-tetracyclin und Doxycyclin das frühere Ansprechen von S-GPT gegenüber S-GOT zu. In der Tetracyclingruppe wurde für S-GPT das gleiche dosis- und zeitabhängige Verhalten beobachtet, wie es auch für die Triglyceride beschrieben wurde. Aus diesen Untersuchungsergebnissen läßt sich, wie aus den eigenen und den Ergebnissen anderer Autoren schließen, daß die Tetracycline sehr vielfältige Auswirkungen auf die Zelle im allgemeinen haben, die in ihrer Gesamtheit noch nicht überschaubar sind.

Erklärung der Abkürzungen in den Tabellen 3 - 11

- n = Anzahl der Tiere in einer Untersuchungsgruppe
- x_i = Mittelwert der Messungen in einer Untersuchungsgruppe mit n Tieren
im Serum: mg/100ml ; in der Leber: mg/g Leber
- s_i = Standardabweichung in einer Untersuchungsgruppe mit n Tieren
- * = diese Untersuchungsgruppe weicht signifikant von der Kontrollgruppe ab
- 2 h = bedeutet nach 2 Stunden ; usw.
- TC = Tetracyclin-HCl
- DC = Doxycyclin
- PMT = Pyrrolidinomethyl-tetracyclin
- K0 = Kontrolltiergruppe
- 10 = Konzentration von 10 mg/kg KG bzw. 10 µg/g KG
- 25 = Konzentration von 25 mg/kg KG bzw. 25 µg/g KG
- 50 = Konzentration von 50 mg/kg KG bzw. 50 µg/g KG
- 100 = Konzentration von 100 mg/kg KG bzw. 100 µg/g KG

Die Zahlen in Spalte II bedeuten:

- a) bei der Kontrollgruppe (K0) = arithmetischer Mittelwert der
Messungen in dieser Gruppe
- b) bei den Antibiotikagruppen = Abweichung des Mittelwertes aus
n Messungen vom Mittelwert der
Kontrollgruppe

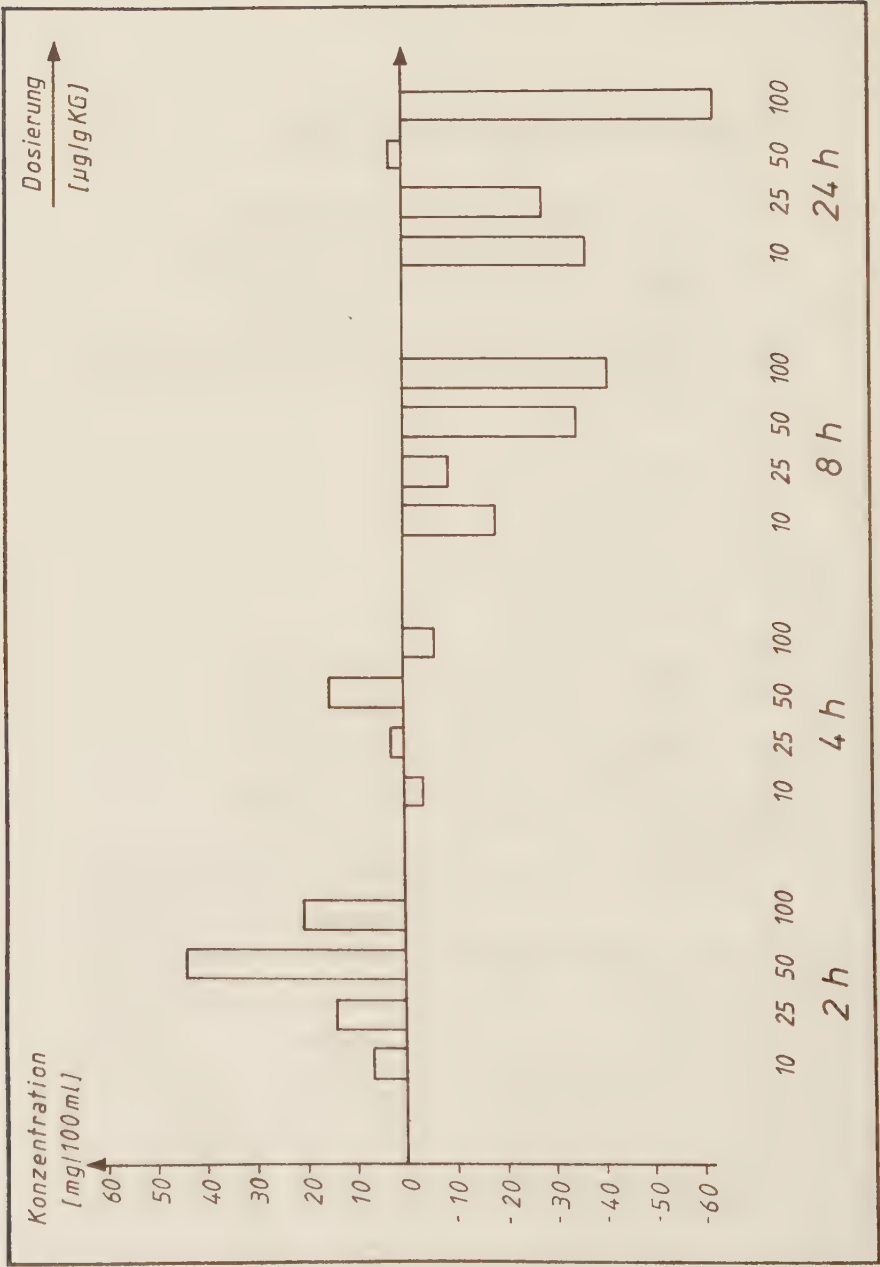


Abb.: 6

Veränderungen des Triglyceridgehalts im Serum nach 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Tetracyclin-HCl i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq$ 0,05

		2 h		4 h		8 h		24 h	
TC-KO	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$		83,91		105,02		117,04		163,18
	s_i	52,66		27,38		60,41		51,45	
TC-10	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	90,53	+6,62	101,24	-3,78	98,35	-18,69	126,08	-37,10
	s_i	26,51		29,24		119,69		52,89	
TC-25	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	97,95	+14,04	107,7	+2,68	108,11	-8,93	134,96	-28,22
	s_i	20,99		72,74		50,4		67,83	
TC-50	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	127,25	+44,34	120,43	+15,11	61,75	-35,29	165,59	+2,41
	s_i	59,97		50,88		22,42		57,95	
TC-100	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	104,68	+20,77	98,63	-6,34	75,56	-41,46	100,17	-63,01
	s_i	34,92		27,82		36,57		56,02	

Tab.: 3

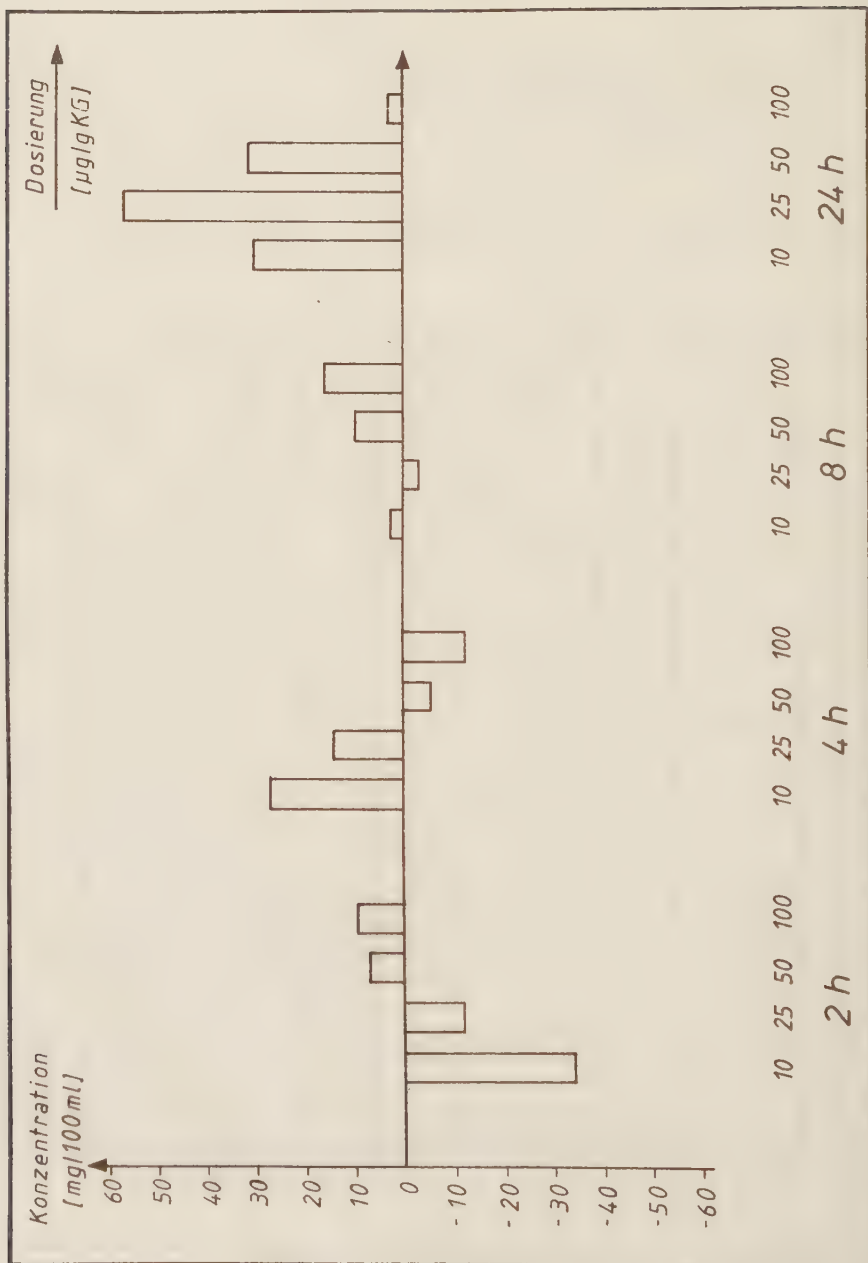


Abb.: 7

Veränderungen der Triglyceridgehalts im Serum nach 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Doxycyclin i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		2 h		4 h		8 h		24 h	
DC-KO	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$		127,61		92,46		81,35		127,3
	s_i	54,56		22,31		23,48		35,92	
DC-10	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	93,35	-34,26	119,26	+26,8	84,22	+ 2,87	157,7	+30,4
	s_i	24,15		41,99		16,95		20,53	
DC-25	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	115,69	-11,92	106,43	+13,97	77,16	-3,19	183,12	+55,82
	s_i	28,73		40,74		25,6		68,66	
DC-50	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	134,65	+7,04	87,05	-5,41	91,32	+9,97	158,67	+31,37
	s_i	31,56		19,21		30,34		60,55	
DC-100	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	137,1	+9,49	80,05	-12,41	97,93	+16,58	130,4	+3,1
	s_i	32,89		29,75		40,74		42,61	

Tab.: 4

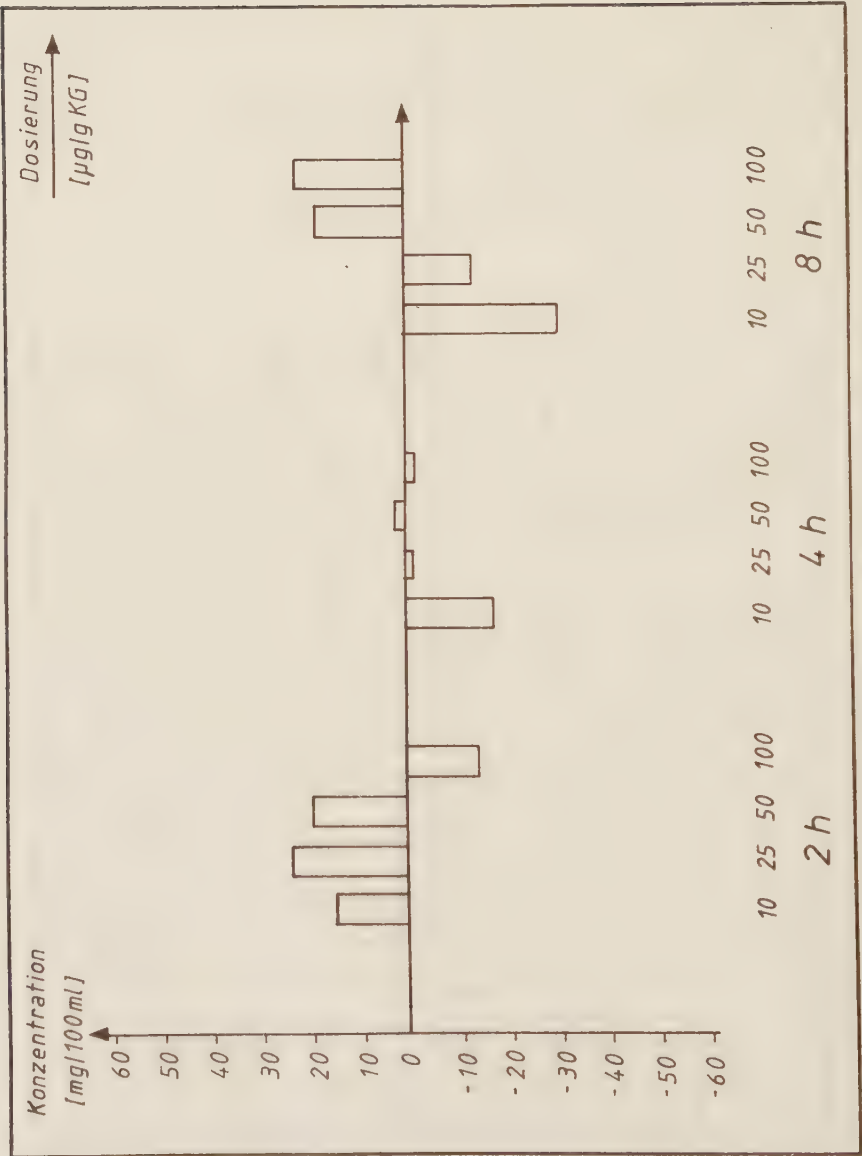


Abb.: 8 Triglyceridkonzentration im Serum nach einmaliger intravenöser Injektion von

Abb.: 8

Veränderungen des Triglyceridgehalts im Serum nach 2, 4 und 8 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Pyrrolidinomethyl-tetracyclin i.v. ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden
p $\leq$ 0,05

		2 h		4 h		8 h	
PMT-KO	n	10		10		5	
	$\bar{x}_i$		109,1		129,2		165,4
	s_i	25,98		33,85		21,82	
PMT-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	124,6	+17,5	112,6	-16,6	135,2	-30,2
	s_i	32,38		31,35		51,69	
PMT-25	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	132,6	+23,5	127,6	-1,6	142,1	-23,3
	s_i	33,96		31,98		43,55	
PMT-50	n	10		9		10	
	$\bar{x}_i$	128,9	+19,8	131,8	-2,6	174,1	+8,7
	s_i	25,58		51,3		44,27	
PMT-100	n	9		10		10	
	$\bar{x}_i$	97,0	-12,1	127,3	-1,9	178,2	+12,8
	s_i	18,79		45,76		61,99	

Tab.: 5



Abb.: 9 Triglyceridkonzentration im Serum nach einmaliger intravenöser Injektion von

Abb.: 9

Veränderungen des Triglyceridgehalts im Serum nach 24, 48 und 72 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Pyrrolidinomethyl-tetracyclin i.v. ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq$ 0,05

		24 h		48 h		72 h	
PMT-KO	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$		102,0		145,2		107,5
	s_i	36,86		30,26		24,31	
PMT-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	84,6	-17,4	145,9	+0,7	84,5	-23,0
	s_i	25,14		45,61		16,72	
PMT-25	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	95,64	-6,4	151,6	-6,4	122,4	+14,9
	s_i	46,46		27,44		44,54	
PMT-50	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	119,9	+17,9	148,2	+3,0	89,1	-18,4
	s_i	22,9		69,05		21,82	
PMT-100	n	10					
	$\bar{x}_i$	118,6	+16,6				
	s_i	34,76					

Tab.: 6

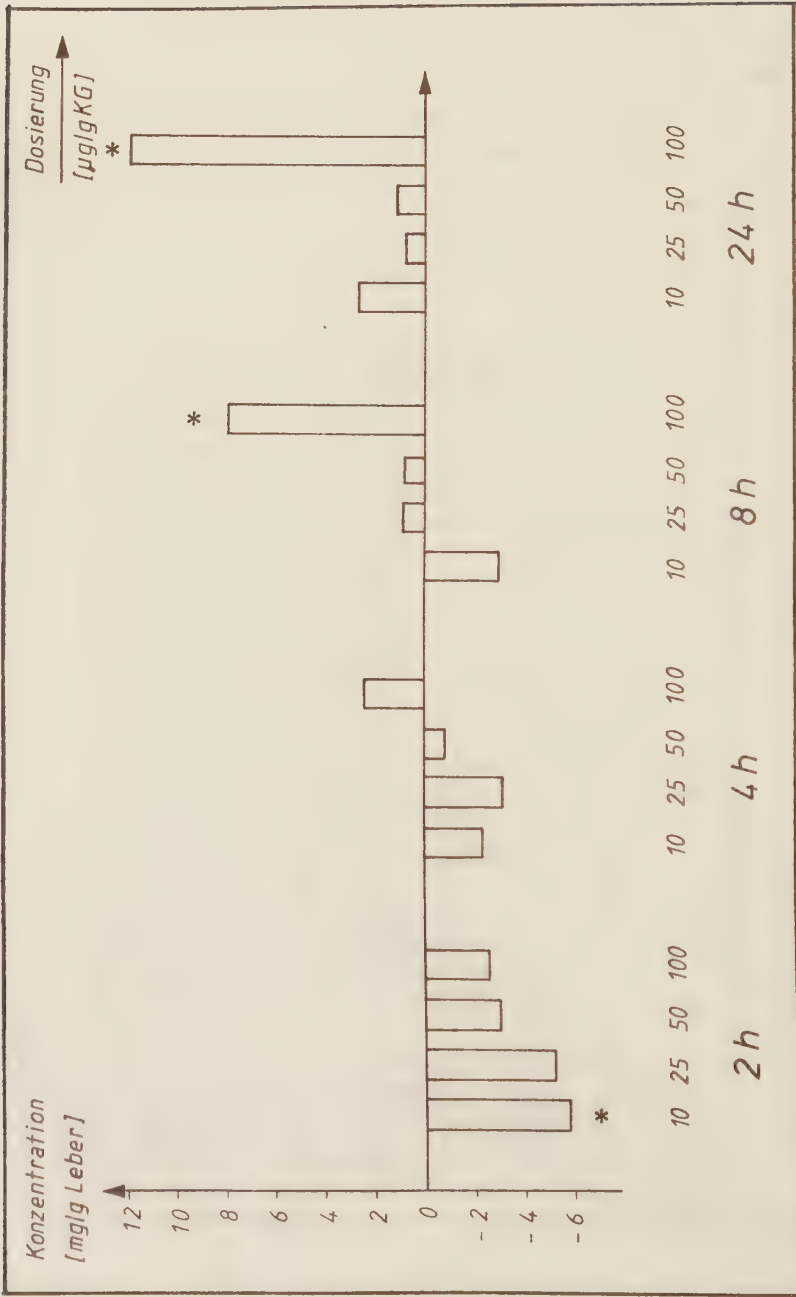


Abb.: 10 Triglyceridkonzentration in der Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von Tetracyclin-HCl

Abb.: 10

Veränderungen im Triglyceridgehalt der Leber nach 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Tetracyclin-HCl i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		2 h		4 h		8 h		24 h	
TC-KO	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$		16,0		13,2		13,0		7,4
	s_i	6,55		4,21		3,20		0,90	
TC-10	n	10	*	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	10,1	-5,9	10,8	-2,4	10,0	-3,0	10,1	+2,7
	s_i	1,57		1,63		2,86		2,53	
TC-25	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	10,7	-5,3	10,0	-3,2	14,0	+1,0	8,1	+0,7
	s_i	1,51		1,63		3,41		1,37	
TC-50	n	10		10		10		10	
	$\bar{x}_i$	12,9	-3,1	12,3	-0,9	13,9	+0,9	8,5	+1,1
	s_i	2,20		3,25		2,31		1,19	
TC-100	n	10		10		10	*	10	*
	$\bar{x}_i$	13,4	-2,6	15,6	+2,4	21,1	+8,1	19,5	+12,1
	s_i	4,08		1,98		6,70		6,12	

Tab.: 7

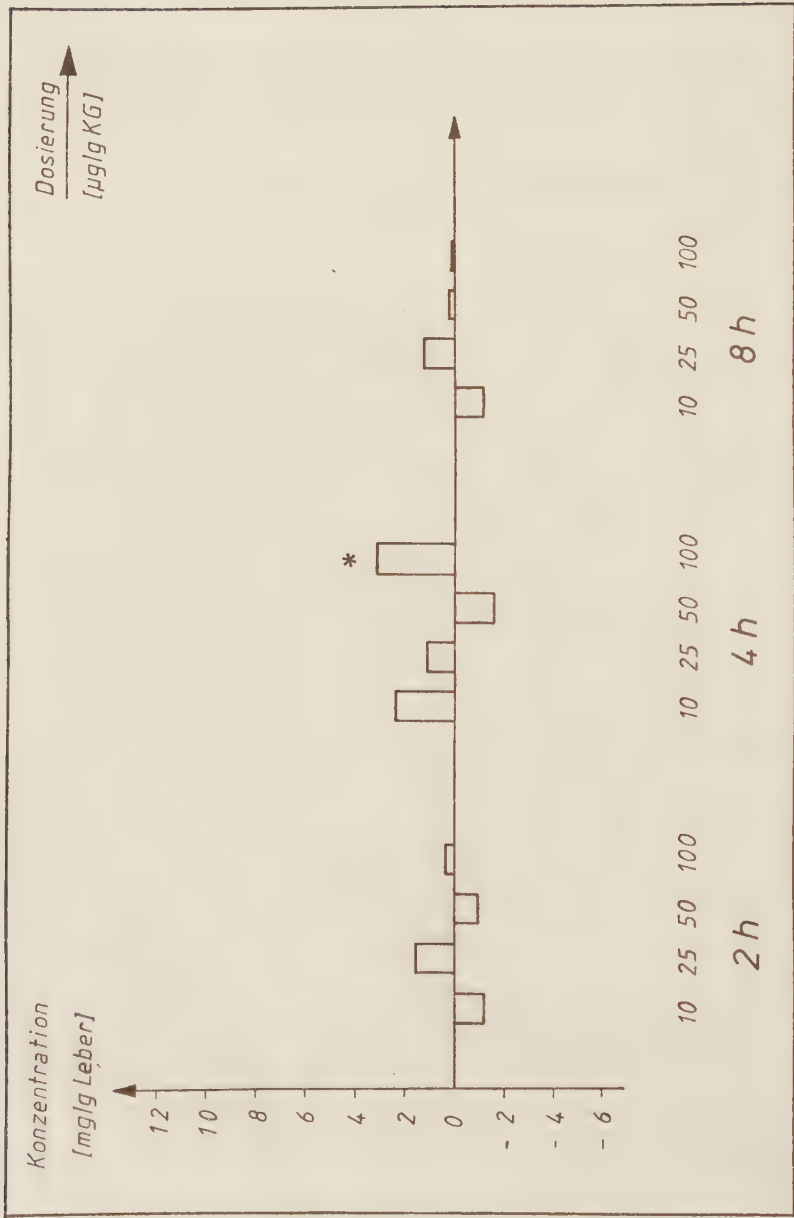


Abb.: 11

Triglyceridkonzentration in der Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von Doxycyclin

Abb.: 11

Veränderungen im Triglyceridgehalt der Leber nach 2, 4 und 8 Stunden
nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Doxycyclin i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		2 h		4 h		8 h	
DC-KO	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$		8,8		9,2		9,9
	s_i	2,37		2,42		1,82	
DC-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	7,6	-1,2	11,1	+1,9	8,5	-1,4
	s_i	0,79		0,70		2,06	
DC-25	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	10,4	+1,6	10,2	+1,0	11,2	+1,3
	s_i	4,53		1,11		1,82	
DC-50	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	7,8	-1,0	7,3	-1,9	10,1	+0,2
	s_i	1,02		2,24		2,50	
DC-100	n	10		10	*	10	
	$\bar{x}_i$	9,2	+0,4	12,4	+3,2	10,0	+0,1
	s_i	2,15		3,22		1,22	

Tab.: 8

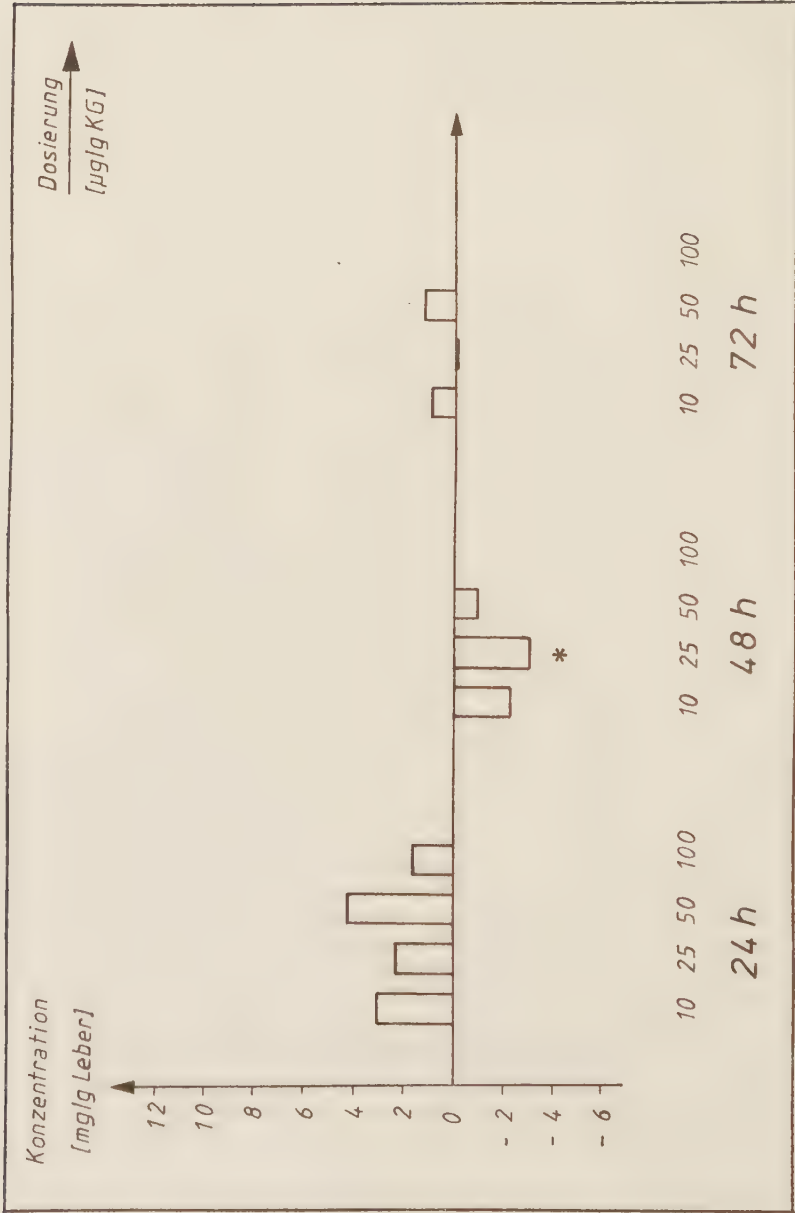


Abb.: 12 Triglyceridkonzentration in der Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von Doxycyclin

Abb.: 12

Veränderungen im Triglyceridgehalt der Leber nach 24, 48 und 72 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Doxycyclin i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		24 h		48 h		72 h	
DC-KO	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$		13,5		11,2		6,8
	s_i	2,87		1,44		1,86	
DC-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	16,6	+3,1	8,9	-2,3	7,8	+1,0
	s_i	3,55		2,51		1,09	
DC-25	n	10		10	*	10	
	$\bar{x}_i$	15,9	+2,4	8,1	-3,1	6,7	-0,1
	s_i	2,27		1,79		1,73	
DC-50	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	17,7	+4,2	10,2	-1,0	8,1	+1,3
	s_i	3,49		1,56		1,73	
DC-100	n	9					
	$\bar{x}_i$	15,2	+1,7				
	s_i	3,82					

Tab.: 9

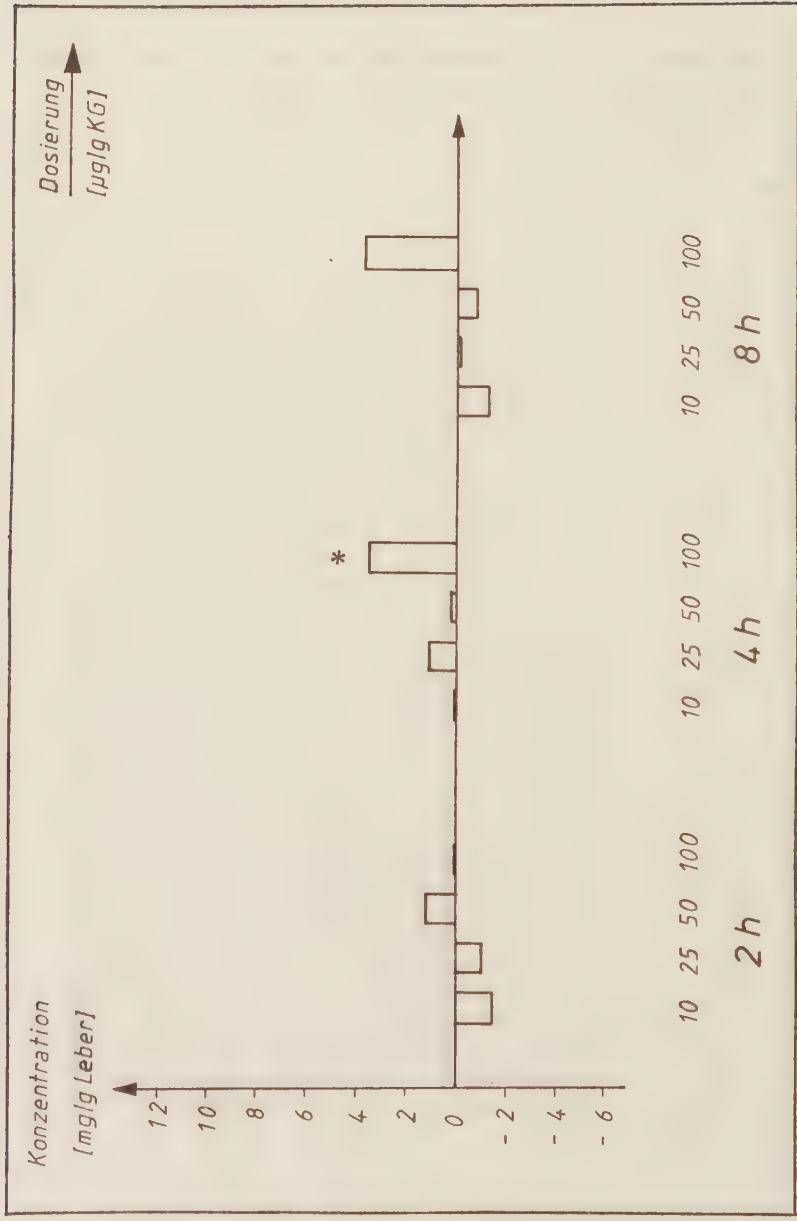


Abb.: 13 Triglyceridkonzentration in der Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von Pyrolidinomethyl-tetracyclin

Abb.: 13

Veränderungen im Triglyceridgehalt der Leber nach 2, 4 und 8 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Pyrrolidinomethyl-tetracyclin i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		2 h		4 h		8 h	
PMT-KO	n	10		10		5	
	$\bar{x}_i$		14,2		9,0		10,5
	s_i	3,54		2,23		3,70	
PMT-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	12,8	-1,4	9,0	0	9,2	-1,3
	s_i	2,77		1,05		1,97	
PMT-25	n	10		9		10	
	$\bar{x}_i$	13,2	-1,0	10,1	+1,1	10,4	-0,1
	s_i	2,33		1,79		2,05	
PMT-50	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	15,5	+1,3	9,2	+0,2	9,8	-0,7
	s_i	2,32		1,53		1,55	
PMT-100	n	10		10	*	10	
	$\bar{x}_i$	14,2	0	12,5	+3,5	14,3	+3,8
	s_i	2,44		1,73		3,01	

Tab.: 10

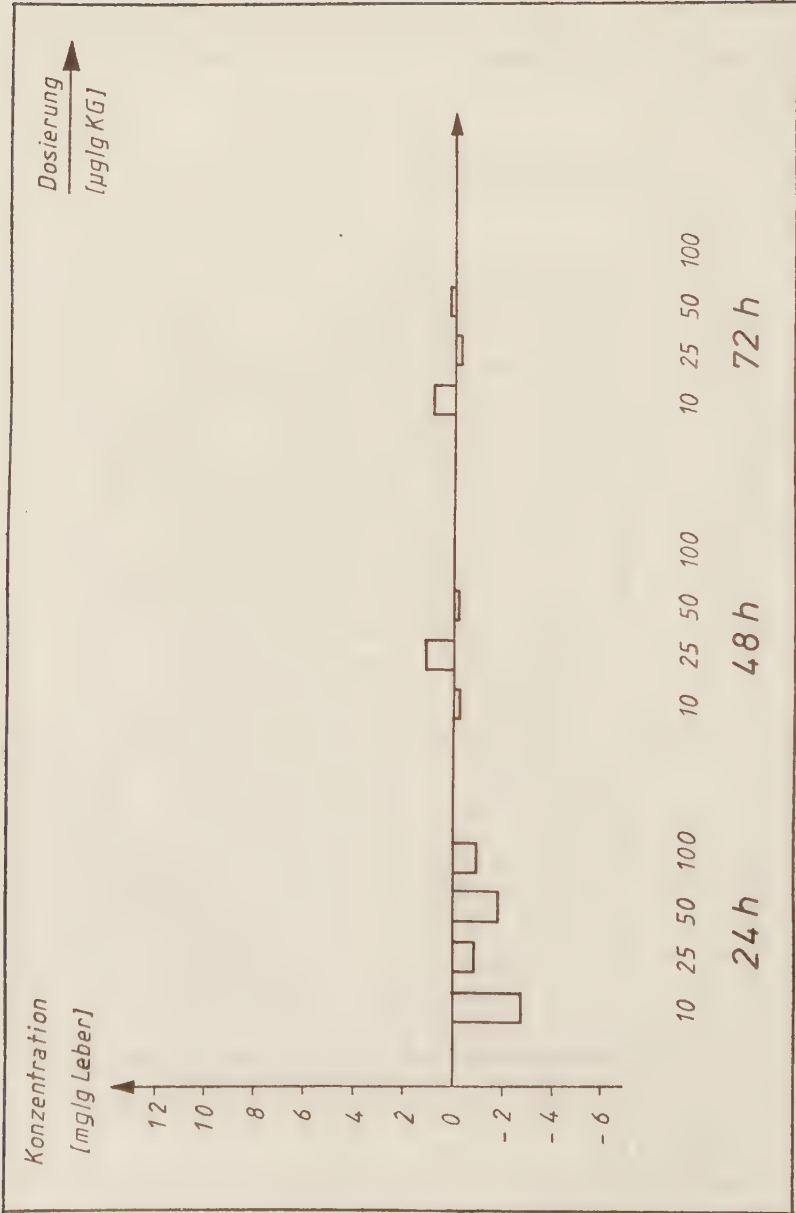


Abb.: 14

Triglyceridkonzentration in der Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von
Pyrrolidinomethyl-tetracyclin

Abb.: 14

Veränderungen im Triglyceridgehalt der Leber nach 24, 48 und 72 Stunden nach Verabreichung einer einmaligen Gabe von Pyrrolidinomethyl-tetracyclin i.v.

($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

* = Wert vom zugehörigen Kontrollwert signifikant verschieden

p $\leq 0,05$

		24 h		48 h		72 h	
PMT-KO	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$		11,5		6,5		7,4
	s_i	1,78		0,73		1,07	
PMT-10	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	8,8	-2,7	6,2	-0,3	8,2	+0,8
	s_i	2,54		0,56		1,79	
PMT-25	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	10,6	-0,9	7,6	+1,1	7,1	-0,3
	s_i	2,49		1,64		0,73	
PMT-50	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	9,7	-1,8	6,3	-0,2	7,7	+0,3
	s_i	1,80		0,74		0,90	
PMT-100	n	10		10		10	
	$\bar{x}_i$	10,5	-1,0				
	s_i	1,73					

Tab.: 11

5.6. Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit untersucht anhand einer einmaligen intravenösen Injektion von Tetracyclin-HCl, Doxycyclin und Pyrrolidinomethyl-tetracyclin die akute Toxizitätsschwelle der einzelnen Tetracyclinderivate. Als Parameter wurden die Serumtriglyceride und das Auftreten einer Triglyceridakkumulation in der Leber gewählt. Geschlechtsreife männliche NMRI-Mäuse mit Gewichten zwischen 20 g und 28 g wählten wir als Untersuchungsmodell. Alle Tetracyclinderivate wurden als Reinsubstanzen eingesetzt und in 1,5 mMol MgSO_4 -Lösung gelöst injiziert. Die Lösungen wurden vor den Injektionen jeweils frisch hergestellt. Die verwendeten Tetracyclinderivate wurden gaschromatographisch auf Abwesenheit unerwünschter Zerfallsprodukte und Gehalt hin überprüft. Die Antibiotikakonzentrationen betrugen 1 000 $\mu\text{g/ml}$, 2 500 $\mu\text{g/ml}$, 5 000 $\mu\text{g/ml}$ und 10 000 $\mu\text{g/ml}$ Lösung. Von diesen Lösungen erhielten die Mäuse pro g KG Antibiotikadosen von 10, 25, 50 und 100 μg via Schwanzvene injiziert. Nach 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, und im Serum und in der Leber die Triglyceride vollenzymatisch bestimmt.

Eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Triglyceride im Serum und ein dazu parallellaufender Anstieg der Triglyceride in der Leber konnte von uns nur beim Tetracyclin-HCl in einer Dosierung von 100 mg/kg KG in Übereinstimmung mit anderen Autoren (195 - 207, 226, 233, 234) beobachtet werden. Im Vergleich zu früheren Autoren wurden in vorliegender Arbeit die zeitkorrelierten dosisabhängigen Beziehungen der Triglyceride in Serum und Leber quantitativ erfaßt. Gleichzeitig konnte der reversible Charakter der Veränderungen deutlich gemacht werden.

Für die Verschiebung der Toxizitätsgrenze (199) auf höhere Dosen aller drei verwendeten Tetracyclinderivate, wobei beim Pyrrolidinomethyl-tetra-

cyclin und beim Doxycyclin diese Grenze in unseren Versuchen nicht erreicht worden ist, können wir folgende Deutung anbieten:

- 1) Die intravenös applizierte Testdosis unterliegt primär einer Verteilung auf die verschiedenen Gewebe und Organe (= Verdünnungseffekt).
- 2) Der in früheren Arbeiten (170 - 173, 175, 176, 187) angeklungene protektive Effekt von Mg^{2+} -Ionen auf die Toxizität der Tetracycline spielt offensichtlich selbst in einer so niedrigen Konzentration von 1,5 mMol eine nicht unerhebliche Rolle (= Protektionseffekt).

Wir hoffen mit der vorliegenden standardisierten tierexperimentellen Studie einen Beitrag zur Schließung einer Lücke im Verständnis der Pharmakologie der Tetracycline geleistet zu haben, und wir möchten damit zu weiteren Anstrengungen zur Lösung noch offener Fragen Anlaß geben.

Literaturverzeichnis :

- 1 B.M.Duggar, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 175 (1948)
- 2 A.C.Finlay, G.L.Hobby, S.Y.P'An, P.P.Regna, J.B.Routien, O.B.Seeley, G.M.Shull, B.A.Sobin, J.A.Solomons, J.W.Vinson und J.H.Kane, Science 111, 85 (1950)
- 3 J.H.Boothe, J.Morton, J.P.Petisi, R.G.Wilkinson und J.H.Williams, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4621 (1953)
- 4 L.H.Conover, W.T.Moreland, A.R.English, C.R.Stephens und F.J.Pilgrim, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4622 (1953)
- 5 P.P.Minieri, M.C.Firman, A.G.Mistrella, A.Abbey, C.E.Bricker, N.E.Rigler und H.Sokol, Antibiot. Annu., 81 (1953 - 1954)
- 6 J.R.D.McCormick, N.O.Sjolander, U.Hirsch, E.R.Jensen und A.P.Doerschuk, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4561 (1957)
- 7 R.Reiner, Antibiotika, B 1 Thieme Taschenlehrbuch d. Organ. Chemie, Stuttgart 1974, S. 27 - 31 und S. 147 - 158
- 8 F.A.Hochstein, C.R.Stephens, L.H.Conover, P.P.Regna, R.Pasterneck, P.N.Gordon, F.J.Pilgrim, K.J.Brunings und R.B.Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 75, 5455 (1953) und 74, 3706 (1952)
- 9 W.Dürkheimer, Angewandte Chemie 87.Jahrgang, Heft 21, S. 751 - 764 (1975)
- 10 J.Donohue, J.D.Dunitz, K.N.Trueblood und M.S.Webster, J. Amer. Chem. Soc. 85, 851 (1963)

- 11 Y.Takeuchi und M.T.Guerger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46,
1366 (1960)
- 12 M.Schach von Wittenau, R.K.Blackwood, L.H.Conover, R.H.Clauert
und R.B.Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 87, 134 (1965)
- 13 M.Schach von Wittenau und R.K.Blackwood, J. Org. Chem. 31,
613 (1966)
- 14 H.Muxfeldt, G.Hardtmann, F.Kathawala, E.Vedays und
J.B.Mooberry, J.Amer. Chem. Soc. 90, 6534 (1968)
- 15 G.Erhart und H.Ruschig, Arzneimittel, Bd. 2, S. 1705,
Verlag Chemie, Weinheim 1968
- 16 R.Brunner und G.Machek, Die Antibiotika, Bd. 1, II. Teil,
S. 314, Verlag Hans Carl, Nürnberg 1962
- 17 C.R.Stephens, K.Murai, K.J.Brunings und R.B.Woodward,
J. Amer. Chem. Soc. 78, 4155 (1956)
- 18 L.A.Mitscher, B.Slater-Eng und T.D.Sokoloski, Antimicrob.
Ag. Chemother. 66, (1972) und dort zitierter Lit.
- 19 L.A.Mitscher, A.C.Bonacci und T.D.Sokoloski, Tetrahedron
Lett., 5361 (1968)
- 20 D.L.J.Clive, Quart. Rev. Chem. Soc. 22, 435 (1968)
- 21 C.J.Jarowski, Vortrag 6. Pan. Am. Congr. Pharm. Biochem.,
Mexico City (1963)
- 22 D.A.Husser, J. Pharm. Pharmacol. 20, 539 (1968)
- 23 E.G.Remmers, N.C.Barringer, G.M.Sieger, N.Anagnostakos,
J.Corbett und P.A.Doerschuk, J. Pharm. Sci. 54, 49 (1966)

- 24 W.A.Baker und P.M.Brown, J.Amer. Chem. Soc. 88, 1314 (1966)
- 25 J.T.Doluisio und A.N.Martin, J.Med. Chem. 6, 16 (1963)
- 26 K.Taguchi, Chem. Pharm. Bull. 8, 205, 212, 217 (1960)
- 27 A.Albert, Nature 172, 201 (1953)
- 28 A.Albert und C.W.Rees, Nature 177, 434 (1956)
- 29 L.A.Mitscher, A.C.Bonacci und T.D.Sokoloski, Antimicrob. Ag. Chemother., 78 (1968)
- 30 L.A.Mitscher, A.C.Bonacci, B.Slater-Eng, A.K.Hacker und T.D.Sokoloski, Antimicrob. Ag. Chemother., 111 (1969)
- 31 M.M.Noseworthy, US-Pat. 3009956 (1961), Chas. Pfizer & Co.
- 32 J.C.Muni und G.Foltran, Bull. Soc. Chim. Fr., 4141 (1971)
- 33 T.V.Alykova, Antibiotiki 17, 353 (1972)
- 34 A.H.Cashwell, J. Membr. Biol. 7, 345 (1972)
- 35 A.H.Cashwell und J.D.Hutchison, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 625 (1971)
- 36 A.Stahlavska, M.S.Tawakkol, V.Slansky und M.Frslinkowa, Pharmazie 27, 456 (1972)
- 37 P.J.Neuvoonen, G.Gothoni, R.Hackmann und K.Bjorksten, Brit. Med. J. 4, 532 (1970)
- 38 Brit. Med. J. 4, 509 (1970)
- 39 M.J.Mattila, P.J.Neuvoonen, G.Gothani und C.R.Hackmann, Proc. Eur. Soc. Study Drug Toxicity 13, 128 (1972)

- 40 A.Forsgren und H.Gnarpe, Nature New Biol. 244, 82 (1973)
- 41 E.H.Gans und T.Higachi, J. Amer. Pharm. Assoc. 46, 458 (1957)
- 42 W.Wessel, M.Schoog und F.Winkler, Arzneimittelforsch. 21, 1468 (1971)
- 43 J.Wieriks und H.E.Schornagel, Chemotherapie 16, 85 (1971)
- 44 DOS 1 767 891 (1968) Pfizer GmbH
- 45 J.Krieglstein, Arzneimittelforsch. 23, 1527 (1973)
- 46 M.Schach von Wittenau und R.Yeary, J.Pharmacol. Exp. Ther. 140, 258 (1963)
- 47 W.Scholtan, Arzneimittelforsch. 13, 347 (1963)
- 48 W.Scholtan, Arzneimittelforsch. 18, 505 (1968)
- 49 G.Powis, J.Pharm. Pharmacol. 26, 113 (1974)
- 50 R.L.Searey, J.A.Forman, H.D.Myers und L.M.Berquist, Antimicrob. Ag. Chemother., 471 (1963)
- 51 E.Genazzani, L.J.Bononi, G.Pagnini und F.DiCarlo, Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy Proc. 6. Int. Congr. Chemother., Tokyo (1970), Vol.I, S. 245, dort weitere Lit.
- 52 T.Perenyi, S.Szoke und E.K.Nowak, Acta Pharm. Hung. 42, 220 (1972)
- 53 J.K.H.Ma, H.W.Jun und L.A.Luzzi, J. Pharm. Sci. 62, 1261 (1973)
- 54 G.N.Rolinson, Int. J.Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., Suppl. 5 S. 2 (1972)

- 55 J.P.F.Whehan und J.McFadzean in T.B.Binns, Absorption and Distribution of Drugs, Livingstone, Edinburgh (1964)
- 56 W.Scholtan und J.Schmid, Arzneimittelforsch. 12, 748 (1962)
- 57 A.Albert, Selected Toxicity, 5. Aufl. Chapman and Hall, London (1973), S. 20
- 58 E.Krüger-Thiemer in E.Fraerksen, Jahresbericht Borstel, Springer, Berlin, Bd. 5. S. 316 (1961)
- 59 J.Crofton, Brit. Med. J., Bd 2, S. 211 (1969)
- 60 D.W.Hughes und W.L.Wilson, Can. J. Pharm. Sci. 8, 67 (1973)
- 61 H.Muxfeldt und R.Bangert, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 21, 80 (1963)
- 62 H.Muxfeldt, Angew. Chem. 74, 443, 825 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. I, 372 (1962)
- 63 D.L.J.Clive, Quart. Rev. Chem. Soc. 22, 435 (1968)
- 64 T.Money und A.I.Scott, Progr. Org. Chem. 7, 1 (1968)
- 65 R.K.Blackwood in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2. Aufl., Vol.18, Wiley, New York (1969)
- 66 G.C.Barret, J.Pharm. Sci. 52, 309 (1963)
- 67 J.J.Hlavka und J.H.Boothe, Fortschr. Arzneimittelforsch. 17, 211 (1973)
- 68 G.Ehart und H.Ruschig, Arzneimittel, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, Bd. 4, S. 368 (1972)

- 69 E.G.Remmers, G.M.Sieger und A.P.Doerschuk, J.Pharm Sci. 52, 752 (1963)
- 70 D.A.Hussar, P.J.Niebergall, E.T.Sugita und J.T.Doluisio, J. Pharm. Pharmacol. 20, 539 (1968)
- 71 C.T.Agostini und Ch.R.Kowarski, Pharm. Acta Helv. 47, 560 (1972)
- 72 V.Naggar, N.A.Daabis und M.M.Motawi, Farmazie 29, 129 (1974)
- 73 E.Reuter, Med. Klin. (München) 67, 1256 (1972)
- 74 A.M.Walter und L.Heilmeyer, Antibiotikafibel, 3. Aufl., Thieme - Verlag, Stuttgart, S. 16 (1969)
- 75 E.Wiesmann, Med. Mikrobiol., 4. Aufl., Thieme - Verlag, Stuttgart (1978)
- 76 J.Fabre, E.Milek, P.Kalfopoulos und G.Merier, Schweiz. Med. Wschr. 101, 593 - 598 und 625 - 633 und dort zit. Lit. (1971)
- 77 M.Schach von Wittenau, Some pharmacokinetic aspects of doxycycline metabolism in man, Chemotherapy (Basel), Suppl. 13, 41 (1968)
- 78 H.Welch, Absorption, excretion and distribution of Terramycin, Ann. N.Y. Acad. Sci. 53, 253 (1950)
- 79 H.Welch, Principles and practice of antibiotic therapy, S. 196, Medical Encyclopedia Verlag, New York (1954)
- 80 H.Welch, Principles and practice of antibiotic therapy, S. 235, Medical Encyclopedia Verlag, New York (1954)
- 81 H.Welch, Principles and practice of antibiotic therapy, S. 351, Medical Encyclopedia Verlag, New York (1954)

- 82 M.M.Musselman, Terramycin (oxytetracycline), Antibiotics monographs, Nr. 6, S. 25. Medical Encyclopedia Verlag, New york (1956)
- 83 J.E.Rosenblatt, J.F.Barret, J.L.Brodie und W.M.M.Kirby, Comparison of in vitro activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines, Antimicrob. Ag. Chemother. 6, 134 (1966)
- 84 R.S.Harcourt und M.Hamburger, The effect of magnesium sulfate in lowering tetracyclineblood levels, J. Lab. clin. Med. 50, 464 (1957)
- 85 M.Walter und W.Heilmeyer, Antibitika-Fibel, 3. Aufl., S. 269, Thieme-Verlag, Stuttgart (1969)
- 86 M.Giromini, R.Wasem, G.Mérrier und J.Fabre, Influence de l'anurie et des hémodialyses sur le comportement des antibiotiques, Praxis 58, 1181 (1969)
- 87 J.Fabre, Antibiotiques et insuffisance rénale, Med. et Hyg. (Genève) 27, 350 (1969)
- 88 M.E.Florey, Oxytetracycline, The clinical application of antibiotics, Bd. III, S. 238, Oxford University Press, London (1957)
- 89 C.M.Kunin, A.C.Dornbush und M.Finland, Distribution and excretion of four tetracycline analogues in normal young men, J.clin. Invest. 38. 1950 (1959)
- 90 G.Mérrier, M.Rudhardt, A.Herrera, R.Wasem und J.Fabre, Le comportement de l'oxytetracycline en cas d'insuffisance rénale, Schweiz. med. Wschr. 100, 1442 (1970)

- 91 T.Dimmling, Bakteriologische Untersuchungen über die Resorption und Exkretion sowie über das Wirkungsspektrum von Alpha-6-Desoxyoxytetracyclin (Doxycyclin), Med. Klin. 62, 1269 (1967)
- 92 J.Fabre, J.P.Kunz, C.Virieux, J.L.Laurencet und J.S.Pitton, Le comportement de la doxycycline chez l'homme, Chemotherapy, Suppl. 13, S. 23 (1968)
- 93 J.Fabre, J.S.Pitton, C.Virieux, F.L.Laurencet, J.P.Bernhardt und J.C.Godel, La doxycycline, Absorption, distribution et excrétion d'un nouvel antibiotique à large spectre chez l'homme, Schweiz. med. Wschr. 97, 915 (1967)
- 94 J.Monnier und R.Bourse, Activité antibactérienne "in vitro" et concentrations sanguines de la doxycycline, 5. internat. Chemotherapie-Kongress A 1-6/20, Wien (1967)
- 95 H.J.Simon, S.J.Yaffe, V.J.Fontana und S.G.Axline, Clinical pharmacology of antimicrobials in premature infants and children, III, Alpha-6-deoxyoxytetracycline (doxycycline), Antimicrob. Ag. Chemother. 6, 121 (1966)
- 96 G.M.Williamson, Laboratory studies on Vibramycin (doxycycline), Bull. Chim. Therap. I, 53 (1969)
- 97 J.R.Migliardi und M.Schach von Wittenau, Pharmacokinetic properties of doxycycline in man, 5. internat. Chemotherapie-Kongress B 19/10, Wien (1967)
- 98 M.Schach von Wittenau und J.Chiani, A pharmacokinetic analysis of the absorption and elimination of doxycycline in man, Chemotherapy (Basel) 13, 249 (1968)
- 99 F.Reubi, Elimination et posologie de la pyrrolidino-méthyl-tetracycline (PMT) chez les insuffisances rénaux, J.Urol. Néphrol. 73, 306 (1967)

- 100 C.M  rier, F.L.Laurencet, M.Rudhardt, A.Chuit und J.Fabre, Behaviour of doxycycline in renal insufficiency, *Helv. med. Acta* 35, 124 (1969/70)
- 101 F.W.Kraus, D.W.Casez und V.Johnson, Aureomycin and Terramycin in human saliva, *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 78, 554 (1951)
- 102 A.L.DeMaynard, J.C.Andriola und A.Prigot, Tetracycline hydrochloride studies on absorption, diffusion, excretion and clinical trial, *Antibiot. Ann.*, 102 (1953/54)
- 103 J.Fabre, J.S.Pitton und J.P.Kunz, Distribution et excretion de la doxycycline chez l'homme, *Chemotherapia (Basel)* 11, 73 (1966)
- 104 M.H.Pindell, K.M.Cull, K.M.Doran und H.L.Dickison, Absorption and excretion studies on tetracycline, *J.Pharmacol. exp. Ther.* 125, 287 (1959)
- 105 M.Schach von Wittenau und C.S.Delahunt, The distribution of tetracyclines in tissues of dogs after repeated oral administration, *J.Pharmacol. exp. Ther.* 152, 164 (1966)
- 106 W.Pohl, Demethylchlortetracycline in punctats of serous cavities, *Arzneimittel-Forsch.* 14, 1058 (1964)
- 107 C.Milano und B.M.Ciucci, 6-methylene-5-hydroxytetracycline, determination of the levels in the aqueous after oral administrations, *Boll. Oculist.* 44, 719 (1966)
- 108 M.Tsacopoulos, The penetration of Vibramycin (doxycycline) in human aqueous humor, *Ophthalmologica (Basel)* 159, 418 (1969)

- 109 W.S.Wood und G.P.Kipnis, The concentration of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline in the cerebrospinal fluid after intravenous administration, Antibiot. Ann., 98 (1953/54)
- 110 P.R.Heine, Untersuchungen über einige pharmakokinetische Eigenschaften eines neuen Tetracyclin-Derivates: Minocyclin, Diss., Zürich (1969)
- 111 C.Lundberg, C.Gullers und A.S.Malmberg, Antibiotics in sinus secretions, Lancet II, 107 (1968)
- 112 Medical Research Laboratories, Chas. Pfizer & Co., New York, persönliche Mitteilung
- 113 J.Dressler und P.Mach, A study of in vitro incorporation of tetracycline antibiotics into avian and mammalian blood cells, Folia haemat. 84, 368 (1965)
- 114 D.N.Ekzemplyarov, Penetration of tetracycline and streptomycin into macrophages cultured in vitro, Antibiotiki 10, 425 (1965)
- 115 K.W.Kohn, J.Gaskins und D.P.Rall, The distribution of the tetracyclines in the dog, Fed. Proc. 19, 141 (1960)
- 116 P.Málek, J.Hammer, V.Zástava und Z.Pisa, The diagnostic significance of fixation of tetracycline antibiotics in infarcted myocardium, Cor et Vasa (Prag) 7, 125 (1965)
- 117 K.Kovacs, R.Carroll und E.Tapp, Tetracycline fluorescence in renal ischemia, Arch. Path. 78, 552 (1964)
- 118 E.Tapp, R.Carroll und K.Kovacs, The use of tetracycline fluorescence to identify necrosis of renal tubules and to assess renal blood flow, Experientia (Basel) 20, 393 (1964)

- 119 I.Lindgren und J.Raskallio, Accumulation of tetracyclines in atherosclerotic lesions of human aorta, Acta path. microbiol. scand. 66, 323 (1966)
- 120 D.S.Evaskus, D.M.Laskin und A.V.Kroeger, Penetration of lincomycin, penicillin and tetracyclin into serum and bone, Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 130, 89 (1969)
- 121 R.A.Milch, D.P.Rall und J.E.Tobie, Bone localisation of the tetracyclines, J. nat. Cancer Inst. 19, 87 (1957)
- 122 E.D.Titus, T.L.Loo und D.P.Rall, Identification of the bone fluorophore in tetracycline-treated rabbits, Antibiot. Ann. , 949 (1957/58)
- 123 W.M.Sweeney, A.C.Dornbush und S.M.Hardy, Antibiotic activity in urine and feces after oral and intravenous administration of demethylchlortetracycline, New Engl. J. Med. 263, 620 (1960)
- 124 Med. Lett. Drugs Therap. 14, Nr. 2, Issue 340, 7, 11, (1972)
- 125 J.R.D.McCormick in Vanek und Hostalek, Biogenesis of Antibiotic Substances, Academic Press, New York, S. 73 (1965)
- 126 L.A.Mitscher, J.Pharm. Sci. 57, 1633 (1968)
- 127 C.H.Hassalt und G.J.Thomas, Chem. Commun., 1053 (1970)
- 128 E.Brandl in R.Brunner und G.Machek, Die Antibiotika, Bd. 1, 2. Teil, Verlag Hans Carl, Nürnberg, S. 375 (1962)
- 129 F.Lindner, W.Siedel und A.Söder, DBP 1044806 (1959) und 1063598 (1960)
- 130 W.J.Gottstein, W.F.Minor und L.C.Cheney, J. Amer. Chem. Soc., 81, 1198 (1959)

- 131 H.Hartung, F.Caragna, W.Martin und W.Dürkheimer, Arch. Pharm. 307, 651 (1974)
- 132 H.Hartung und W.Dürkheimer, unveröffentlichte Versuche
- 133 A.Brunzell, Acta Chem. Scand. 16, 245 (1962)
- 134 W.Diemair und W.Rödder, Z. Lebensmittel-Unters. Forsch. 111, 365 (1960)
- 135 D.W.Hughes, W.L.Wilson, A.G.Butterfield und N.J.Pound, J. Pharm. Pharmacol. 26, 79 (1974)
- 136 C.R.Stephens, J.J.Beereboom, H.H.Rennhard, P.N.Gordon, K.Murai, R.K.Blackwood und M.Schach von Wittenau, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2643 (1963)
- 137 T.J.Franklin und G.A.Snow, Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Springer Verlag, Heidelberg, S. 111 (1973)
- 138 M.J.Martell und J.H.Boothe, J. Med. Chem. 10, 44 (1967)
- 139 E.Lauscher, München. Med. Wochenschr. 115, 2156 (1973)
- 140 E.Lauscher und G.Stüttgen, Minocyclin-Symposium, Bad Reichenhall, Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
- 141 H.Macdonald, R.G.Kelly, F.S.Allen, J.F.Noble und L.A.Kanegis, Clin. Pharmacol. Ther. 14, 852 (1973)
- 142 J.J.Korst, DOS 2065149 (1972), Pfizer Inc.
- 143 J.J.Korst, DOS 2049941 (1972), Pfizer Inc.
- 144 M.W.Miller und F.A.Hochstein, J. Org. Chem. 27, 2525 (1962)

- 145 W.Martin, H.Hartung, H.Urbach und W.Dürkheimer, Tetrahedron Lett., 3513 (1973)
- 146 R.K.Blackwood und A.R.English, Advan. Appl. Microbiol. 13, 237 (1970)
- 147 P.Bischoff, München. Med. Wochenschr. 113, 353 (1971)
- 148 D.Fritsche und A.Schulz-Stübner, Deut. Med. Wochenschr. 97, 1963 (1972)
- 149 G.B.Roemer und K.Metz, Deut. Med. Wochenschr. 97, 1878 (1972)
- 150 W.Ritzerfeld, München. Med. Wochenschr. 115, 1641 (1973)
- 151 H.Bloch, Schweiz. Med. Wochenschr. 98, 611 (1968)
- 152 E.Reinhard, Pharm. Unserer Zeit I, 9, 67 (1972)
- 153 D.C.Hirsch, G.C.Burton und D.C.Blenden, Antimicrob. Ag. Chemother. 4, 69 (1973)
- 154 G.M.Shub, B.A.Shenderow, V.V.Vorobiew und V.I.Pylaer, Antibiotiki 17, 1025 (1972)
- 155 G.Pulverer, Deut. Med. Wochenschr. 97, 252 (1972)
- 156 K.V.Gopalakrishna und P.I.Lerner, Amer. Rev. Resp. Dis. 108, 1007 (1973)
- 157 Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 17.12.1973 Über Festlegung von Höchstgehalten an unerwünschten Stoffen und Erzeugnissen in Futtermitteln, Anhang 2
- 158 T.J.Franklin und G.A.Snow, Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Springer Verlag, Heidelberg, S. 146 - 170 (1973)

- 159 R.Beuvéniste und J.Davies, *Annu. Rev. Biochem.* 42, 471 (1973)
- 160 T.J.Franklin, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 263 (1973)
- 161 A.I.Laskin und J.A.Last, *Antibiot. Chemother.*(Basel) 17, (1971)
- 162 H.Kersten und G.Tey in V.Kremery, L.Resival und T.Watanabe, *Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance*, Springer Verlag, Berlin (1972)
- 163 A.M.Reynard und L.F.Nellis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1129 (1972)
- 164 E.Buddecke, *Grundriß der Biochemie*, 2.Aufl., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, S. 246 - 257 (1971)
- 165 E.Buddecke, *Grundriß der Biochemie*, 2. Aufl., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, S. 386 - 387 (1971)
- 166 H.D.Summ, E.Draeger und E.von Wasielewski, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 26, 1, 28 - 32 (1976)
- 167 M.Schach von Wittenau, T.M.Twomey und A.C.Swindell, *Chemotherapy* 17, 26 - 39 (1972)
- 168 N.D.Denslow, T.W.O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 9 (1974)
- 169 L.A.Grivell, L.Reijnders und P.Borst, *Biochim Biophys. Acta* 247, 91 (1971)
- 170 I.M.Shapiro, A.C.Burke und Nam Hea Lee, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 26, 595 (1977)
- 171 R.Luthra und M.S.Olson, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol 191, No. 2, December, 494 (1978)

- 172 T.M.Brody, R.Hurwitz und J.A.Bain, Magnesium and the Effect of the Tetracycline Antibiotics on Oxidative Processes in Mitochondria, Antibiotics and Chemother. 9, 861 (1954)
- 173 J.C. van Meter, A.Spector, J.J.Oleson und J.H.Williams, In vitro action of aureomycin on oxidative phosphorylation in animal tissues, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 81, 215 (1952)
- 174 A.H.Caswell, J.Membrane Biol. 7, 345 (1972)
- 175 H.R. de Jonge, Toxicity of tetracyclines in rat-small- intestinal epithelium and liver, Biochem. Pharmacol. 22, 2659 (1973)
- 176 M.E.Shils, Some metabolic aspects of tetracyclines, Clin. Pharm. Ther. 3, No. 3, 321 (1962)
- 177 H.Welch, F.D.Hendricks, C.W.Price und W.A.Randall, Comparative studies on terramycin and aureomycin: antibacterial spectrum, serum concentrations and urinary excretion, J. Am. Pharm. A. (Scient Ed.) 39, 185 (1950)
- 178 H. de Vries und A.M.Kroon, On the effect of chloramphenicol and oxytetracycline on the biogenesis of mammalian mitochondria, Biochemica and Biophysica Acta 204, 531 (1970)
- 179 T.J.Franklin, The inhibition of incorporation of leucine into Protein of cell-free systems from rat liver and Escherichia coli by Chlortetracycline, Biochem. J. 87, 449 (1962)
- 180 R.Rendi und S.Ochoa, Enzyme specificity in activation and transfer of amino acids to ribonucleoprotein particles (Abst.), Science 133, 1367 (1961)
- 181 E.F.Gale und J.P.Folkes, The assimilation of amino acids by bacteria. 15.Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in Staptylococcus aureus, Biochem. J. 53, 493 (1953)

- 182 E.F.Gale und J.P.Folkes, The assimilation of amino acids by bacteria, 18. The incorporation of glutamic acid into the protein fraction of *Staphylococcus aureus*, *Biochem. J.* 55, 721 (1953)
- 183 E.F.Gale und T.F.Paine, The assimilation of amino acids by bacteria, 12. The action of inhibitors and antibiotics on the accumulation of free glutamic acid and the formation of combined glutamate in *Staphylococcus aureus*, *Biochem J.* 48, 298 (1953)
- 184 W.Scheuble und R.Kluthe, Vergleichende Stickstoff-Bilanz-Untersuchungen zur antianabolen Wirkung von Tetracyclinen, *Nieren und Hochdruckkrankheiten* 4, 95 (1975)
- 185 O.Carević und N.Cerelec, *Enzymology* 41, 53 (1971)
- 186 I.H.Goldberg, *Am. J. Med.* 39, 722 (1965)
- 187 M.Ito, *Nagoya J. Med. Sci.* 25, 37 (1962)
- 188 V.M.Sborov und D.A.Sutherland, *Gastroenterology* 18, 598 (1951)
- 189 J.C.Schultz et al., *New England J. Med.* 269, 999 (1963)
- 190 G.R.Pflug, Toxicities associated with tetracycline therapy, *Amer. J. Pharm.* 135, 438 (1963)
- 191 H.F.Dowling und M.H.Lepper, Hepatic reactions to tetracycline, *J. Amer. Med. Ass.* 188, 235 (1964)
- 192 L.D.Wruble und A.J.Cummins, Tetracycline and fatty liver, *Amer. J. Dig. Dis.* 10, 742 (1965)
- 193 P.J.Whalley, F.G.Martin, R.H.Adams und B.Cornes, Tetracycline disposition in normal pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 28, 103 (1966)

- 194 E.Stewart Allen und W.E.Brown, Amer. j. Obst. and Gynecol. 95, 12 (1965)
- 195 J.T.Seto und M.H.Lepper, The effect of chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline administered intravenously on hepatic fat content: A quantitative method of study including failure of some vitamins and other drugs to mitigate the effect, Antibiot. Chemother. 4 666 (1954)
- 196 M.H.Lepper, H.J.Zimmermann, G.Carrol, E.R.Caldwell, H.W.Spies, C.K.Wolfe und H.F.Dowling, Effect of large doses of aureomycin, terramycin and chloramphenicol on livers of mice and dogs, Arch. Int. Med. 98, 284 (1951)
- 197 W.V.Zussman, Hepatic alterations following experimental tetracycline toxicity in rats, Anat. Rec. 162, 301 (1968)
- 198 M.Lewis, S.Schenker und B.Combes, Studies on the pathogenesis of tetracycline-induced fatty liver, Am. J. Dis. 12, 429 (1967)
- 199 S.M.Farhat, D.L.Schelhart und M.M.Musselman, Clinical Observation on toxicity of tetracyclines in man with experimental studies in animals, Antitiotics Annual, 426 (1957/58)
- 200 B.A.Shauer, L.Lukacs und H.J.Zimmerman, Biochemical indices of tetracycline hepatic injury in rats, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 147, 868 (1974)
- 201 S.E.P.Miller, R.N.M.MacSween, A.C.A.Glen, K.Tribedi und F.M.L.Moore, Experimental studies on the hepatic effects of tetracycline, Brit. J. exp. Path. 48, 51 (1966)
- 202 J.E.Gray, R.N.Weaver, P.Skinner, J.Mathews, C.E.Day und K.Stern, Effects of tetracycline on Ultrstructure and Lipoprotein secretion in the rat hepatocyte, Tox. Appl. Pharmacol. 30, 317 (1974)

- 203 C.H.Hansen, L.H.Pearson, S.Schenker und B.Combes, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 128, 146 (1968)
- 204 K.J.Breen, S.Schenker und M.Heimberg, Biochem. et Biophys. Acta 270, 74 (1971)
- 205 K.J.Breen, S.Schenker und M.Heimberg, Fatty liver induced by tetracycline in the rat, Gastroenterology 69, 714 (1975)
- 206 K.J.Breen, S.Schenker und M.Heimberg, Effect of tetracycline on the metabolism of (1-14C)oleate by the liver, Biochem. Pharmacol. 28, 197 (1979)
- 207 H.Popper, E.Rubin, F.Schaffner und F.Paronetto, Drug-induced liver disease, Arch. Int. Med. 115, 128 (1965)
- 208 J.Fabre, E.Milek, P.Kolopoulos und G.Mérrier, Schweiz. Med. Wochenschr. 101, 593, 625 (1971)
- 209 M.Schach von Wittenau und T.M.Twomey, The Disposition of doxycycline by man and dog, Chemotherapy 16, 217 (1971)
- 210 I.C.Bateman, C.T.Klopp, und R.Samson, Effect of Nephrectomy on azotaemia associated with parenteral antibiotic administration, Antibiot. Ann., 531 (1953/54)
- 211 I.C.Bateman, I.R.Barlerio, P.Brice, I.C.Klopp und H.Pierpent, Fatal complications of intensive antibiotic therapy in patients with neoplastic disease,
- 212 O.M.Edwards, E.C.Huskisson und R.T.Taylor, Azotaemie aggravated by tetracyclines, Brit. Med. J. I, 26 (1966)
- 213 E.Reuter, Unererwünschte Wirkungen von Tetracyclinen, Med. Klin. 67, 1256 (1972)
- 214 C.M.Kunin, S.B.Rees, J.P.Merril und M.Finland, Persistence of antibiotic in blood of patients with acute renal failure, J. Clin. Invest. 38, 1487 (1959)

- 215 P.Porpaczy, Doxycyclin bei eingeschränkter Nierenfunktion, Wien. klin. Wschr. 82, 710 (1970)
- 216 D.Markrigiannis, Klinische Erfahrungen mit Vibramycin in der Urologie, Med. Welt 40, 2201 (1969)
- 217 L.Humair und J.Diezi, Münch. med. Wschr. 115, 1557 (1973)
- 218 M.E.Shils, Ann. internat. Med. 58, 389 (1963)
- 219 S.D.J.Yeh und M.E.Shils, Proc. exp. Biol. (N.Y.) 121, 729 (1966)
- 220 J.B.Eastwood, R.R.Bailey, J.R.Curtis, P.E.Gower und H.E. de Wardemer, Lancet 39, II (1970)
- 221 J.Fabre, Médicaments et fonctions rénales, Helv. med. Acta Suppl. 47, 24 (1967)
- 222 J.Fabre, Antibiotiques et insuffisance rénale, Med. et Hyg. (Genève) 27, 350 (1969)
- 223 P.J.Whalley, R.H.Adams und B.Combes, J. Amer. med. Ass. 189, 357 (1964)
- 224 R.K.Stoelting und P.S.Gibbs, Effect of tetracycline therapy on renal function after Methoxyfluorane anaesthesia, Anaesth. a. Analg. 52, 431 (1973)
- 225 F.Y.Kuzucu, Methoxyfluorane, tetracycline and renal failure, J. Amer. Med. Ass. 211, 1162 (1970)
- 226 S.Schenker, K.J.Breen und M.Heimberg, Pathogenesis of tetracycline-induced fatty liver, in Drug and Liver, Schattauer Verlag, Stuttgart, III. internationales Symposium 12. - 14. Okt. 1973 in Freiburg i. Br. (1975)

- 227 P.H.Rosenberg und T.Wahlström, *Acta pharmacol et toxicol.* 34, 46 (1974)
- 228 H.G. du Buy und J.L.Showacre, Selective localisation of tetracyclin in mitochondria of living cells, *Science* 133, 196 (1961)
- 229 D.E.Hyams und K.J.Isselbacher, Prevention of fatty liver by administration of adenosine triphosphate, *Nature* 204, 1196 (1964)
- 230 S.Schenker und J.F.O'Donnell, Effect of maturation on hepatic adenosine triphosphate, *Amer. J. Physiol.* 208, 628 (1965)
- 231 M.Lewis, S.Schenker und B.Combes, Studies on the pathogenesis of tetracycline-induced fatty liver, *Amer. J. dig. Dis.* 12, 429 (1967)
- 232 C.M.Kunin, W.A.Craig, M.Kornguth und R.Monson, Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics, *Ann. Acad. Soc. N.Y.* 226, 214 (1973)
- 233 C.H.Hansen, L.H.Pearson, S.Schenker und B.Combes, Impaired secretion of triglycerids by the liver; a cause of tetracycline-induced fatty liver, *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 128, 143 (1968)
- 234 K.Breen, S.Schenker und M.Heimberg, The effect of tetracycline on the hepatic secretion of triglycerides, *Biochim. Biophys. Acta* 270, 74 (1972)
- 235 R.Infante, K.Koumanov und J.Caroli, Tetracycline-induced fatty liver, *Biochemical mechanisms. Gut* 12, 765 (1971)

- 236 P.C.Tucker und P.D.Webster, Effects on pancreatic protein synthesis and secretion in pigeons, Amer. J. dig. Dis. 17, 675 (1972)
- 237 P.J.Whalley, F.G.Martin, R.H.Adams und b.Combes, Tetracycline disposition in normal pregnancy, Obstet. and Gynecol. 28, 103 (1966)
- 238 L.Lacko, J.Korinek und M.Burger, The interaction of antibiotics of the tetracycline type with serum lipoproteins, Clin. Chim. Acta 4, 800 (1959)
- 239 Vollenzymatische Triglycerid-Bestimmung mod. nach A.W. Wahlefeld in H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd II, Verlag Chemie, Weinheim (1974)
- 240 R.Kessler, Comparative pharmacology of tetracyclin-phosphate, Doxycyclin and Minocyclin, Current Therapeutic Research 22, No. 1, Section 2 (1977)
- 241 G.Mukherjee und S.Mukherjee, J.Antibiotics, Ser. A 22, 45 (1969)
- 242 K.Moorthi, W.D.Becker, T.Geiss und O.Kentner, Vergleichende Gewebe-, Galle- und Serumspiegel nach verschiedene n paren-teralen Tetracyclingenaben, Therapiewoche 24, 28, 3147 (1974)
- 243 T.Dimmling und O.Vanderbeke, Pharmakokinetik oral und intravenös verabreichbarer Tetracyclinpräparate, Med. Klin. 70, 279 (1975)
- 244 Ch. von Marwyck, Zur Frage der Ausscheidung von Tetracyclin im Stuhl, Münch. med. Wschr. 100, 684 (1958)
- 245 F.Rademacher, Zur Frage der Tetracyclinausscheidung im Stuhl nach Behandlung mit Tetracyclin-Phosphat und Pyrrolidin-methyl-tetracyclin, Inaugural-Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (1959)

- 246 T.D.Stanley, W.G.Crouthamel, L.C.Martinelli und J.K.H.Ma,
Mechanism of fluorometric analysis of tetracycline involving
metal compounds, Journ. Pharm. Sci. 67, Nr.11, 1518 (1978)
- 247 P.di Simplicio, A.Pierini und G.Segra, Ligandin release from
liver into blood in rats intoxicated by carbon tetrachloride,
Pharmacol. Research Communications 9, Nr.9, 799 (1977)
- 248 R.E.Kirsch, N.M.Bass, D.Miller, M.Sherman, S.Titmus, E.Louw
und S.J.Saunders, Plasma Ligandin measurements in patients
with liver disease, University of Cape Town MRC Liver Research
Group, Cape Town, South Africa
- 249 J.C.Schultz, J.S.Adamson, W.W.Workman und T.D.Norman, New
Engl. J. med. 269, 999 (1963)

Martin Maywald
Sommerleithe 10
8550 Forchheim
Tel.: 09191/4402

Forchheim, den 12.5.1981

Lebenslauf

Eltern: Vater: Helmut Maywald - DBB Oberbetriebswart i.R.
geb.: 27.01.1911 in Cottbus
gest.: 29.06.1978 in Bayreuth
Mutter: Elise Maywald, geb. Müller - Oberlehrerin i.R.
geb.: 09.11.1906 in Affalterthal
gest.: 06.10.1970 in Schnabelwaid

Geschwister: Christian Maywald - Apotheker
geb.: 23.08.1946 in Schnabelwaid

Ehefrau: Irmtraud Maywald, geb. Luber - Augenoptikerin
geb.: 08.06.1950 in Heilsbronn

persönliche Daten:

1948 : 21.05. Geburtsdatum in Schnabelwaid / Kreis Bayreuth
1954 - 1959 : Besuch der allgemeinen Volksschule in Schnabelwaid
1959 - 1968 : Besuch des Math. - naturwiss. Gymnasiums in Pegnitz
1968 : 23.07. Abitur am Gymnasium Pegnitz
1968 - 1970 : Apothekerpraktikant in der Marktapotheke / Bayreuth bei Apotheker Horst Fischer
1970 : 10.09. Pharmazeutische Vorprüfung an der Regierung von Oberfranken in Bayreuth
1970 - 1975 : Pharmaziestudium an der Universität Erlangen - Nürnberg bei Prof. Dr. Otto Dann
1974 : zum WS 74/75, Beginn des Medizinstudiums an der Universität Erlangen - Nürnberg
1975 : 10.05. pharmazeutisches Staatsexamen an der Uni - Erlangen
18.09. Approbation als Apotheker
1976 : 09.04. Heirat mit Irmtraud Maywald, geb. Luber
1977 : 25.03. Ärztliche Vorprüfung an der Uni - Erlangen
1978 : 31.03. 1. Ärztliche Prüfung
1980 : 01.04. 2. Ärztliche Prüfung
1981 : 06.05. 3. Ärztliche Prüfung

Copy-Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197